

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE SÃO PAULO

PUC-SP

Larissa Gomes Lacerda

Chronic Mild Stress (CMS): um estudo sobre a interação entre manipulação neonatal e
submissão ao protocolo de estressores na vida adulta

MESTRADO EM PSICOLOGIA EXPERIMENTAL:

ANÁLISE DO COMPORTAMENTO

SÃO PAULO

2013

LARISSA GOMES LACERDA

Chronic Mild Stress (CMS): um estudo sobre a interação entre manipulação neonatal e
submissão ao protocolo de estressores na vida adulta

Dissertação apresentada à Banca
Examinadora da Pontifícia Universidade
Católica de São Paulo, como exigência
parcial para obtenção do título de
MESTRE em Psicologia Experimental:
Análise do Comportamento, sob a
orientação do Prof. Dr. Fátima Regina
Pires de Assis

Trabalho parcialmente financiado pelo CNPq

SÃO PAULO

2013

Banca Examinadora

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processo de fotocópia ou eletrônico.

São Paulo, ____ de abril de 2013.

Assinatura: _____

Agradecimentos

Em primeiro lugar a Elze Lacerda, por ser a principal responsável pela realização desse trabalho. Seu incentivo, seu apoio incondicional e sua coragem em apoiar as minhas decisões possibilitaram a conclusão de mais essa saudosa “missão”. A você e a Geraldo Lacerda obrigada sempre será pouco.

À minha orientadora Fátima, por ter topado orientar esse trabalho e, mais que isso, fazer esta pesquisa junto comigo. Obrigada pela dedicação, carinho e claro, pelos bolos maravilhosos que adocicavam a vida no laboratório.

À Nilza Micheletto que me aceitou como “meia-orientanda”, permitindo fazer parte do grupo de CMS. Obrigada pela confiança, pela disponibilidade, pela imensa e essencial ajuda do início ao fim dessa pesquisa. Ter sido sua aluna também foi uma grande HONRA.

Às queridas “chroniquetes”, parceiras de coleta, Laura Rocha e Najara Almeida. Minhas amigas! É impossível pensar nesse trabalho sem a ajuda de vocês. Obrigada, de coração, por tudo (e tudo nesse caso, é MUITA coisa). Esse trabalho é nosso.

A Victoria Albertazzi (Vic), por ser quase a quarta integrante do grupo de pesquisa de Chronic. Eu já te admirava como aluna, passei a te admirar como amiga e como pesquisadora básica! Sou tua fã!

A Mel Totti e Daniel Caro por toda a ajuda nas trocas de estressores. E por sempre aceitarem inclinar a estante com um sorriso enorme no rosto.

A Mauricio, Neusa e Conceição. Pela dedicação ao trabalho, pela convivência diária e intensa de nove meses de coleta, pela disponibilidade, ajuda e paciência. Aprendi muito com vocês. A querida Dinalva, por sempre resolver tudo. Você não tem ideia do quanto sua ajuda foi importante no começo.

À Ziza, pelas manhãs de domingo de coleta, pela disponibilidade e por sempre tentar arrumar um jeito de nos ajudar.

A Bruno Costa, pela disponibilidade em responder às minhas perguntas, em resolver os pepinos de laboratório e por aguentar um barulho intermitente durante seis semanas.

A professora Maria do Carmo que foi extremamente importante pra mim durante o mestrado. Foi um imenso prazer ter sido monitora da sua disciplina. À professora Paula Gioia por ter me dado a chance de ser monitora de Pesquisa Supervisionada e a Denigés (Jazz). Aprendi muito com você. A Maria Eliza por toda atenção e aprendizado.

À banca Maria Amália e Cássia Thomaz, pela leitura e pelas grandes contribuições na qualificação.

Aos grandes amigos, que são minha família de Sampa. Agradecerei pessoalmente a cada um de vocês, mas não posso deixar de citá-los aqui. Carol Kracker (que nunca vai ter ideia da importância dela na minha vida), Samanta Cavalcanti e Luciana Corato. Mel, Henrique Ângelo, Rodrigo Boavista e Julia Fink. Talita Sélios (meu anjo da guarda), André Saconatto, Felipe Souza, Belle Alencar, Bruna Colombo, Fernanda Bittondi. Verdadeiros presentes que o PEXP me deu.

A minha irmã Alice. Ter você aqui comigo foi essencial. À meu irmão Mauricio Lacerda por ser o meu atleta que está sempre na torcida.

A Júlio Vidal. Por toda dedicação e companheirismo sem limites. “O que eu posso fazer pra te ajudar?” nos momentos mais difíceis foram essenciais nesses últimos meses. A você, o meu amor!

A Vovô Benedito, Elzita, Mauricio, Tadeu e Jr por me abrigarem um ano e à Raquel por todo ajuda.

A lista de pessoas muito importantes que ainda falta agradecer é grande. Essa dissertação é resultado da participação de muita gente. De gente daqui, de gente da terrinha, de gente que faz parte da minha vida, me ensinando que nada é possível sem elas. A todos vocês que fizeram parte desses dois últimos anos, de maneira direta e indiretamente, meu muito obrigada.

Lacerda, L.G. (2013). *Chronic Mild Stress (CMS): um estudo sobre a interação entre manipulação neonatal e submissão ao protocolo de estressores na vida adulta*. Dissertação de mestrado. Programa de Estudos Pós-Graduados em Psicologia Experimental: Análise do Comportamento. Pontifícia Universidade Católica de São Paulo. 52 págs.

Orientadora: Fátima Regina Pires de Assis

Linha de Pesquisa: Processos Básicos na Análise do Comportamento

RESUMO

Chronic Mild Stress (CMS) um modelo animal experimental de anedonia induzida através da exposição de ratos a um protocolo de estressores crônicos por um longo período de tempo. No Laboratório do Programa de Pós Graduação em Psicologia Experimental: Análise do Comportamento, uma linha de pesquisa sobre o CMS e a relação com o comportamento operante tem sido desenvolvida desde 2001, como em Pereira, 2009. Diferente de outros estudos realizados nesse laboratório, Pereira (2009) não observou redução da ingestão e preferência de sacarose (anedonia) durante os estressores. Uma das hipóteses levantadas foi que a manipulação neonatal tenha sido uma variável responsável por isso. O objetivo do presente estudo foi investigar se a manipulação neonatal, altera a ingestão e preferência de líquidos em ratos que passaram pelo protocolo de estressores (CMS) durante a fase adulta. Três grupos foram divididos entre as condições experimentais: 1) manipulação neonatal, 2) protocolo e 3) manipulação neonatal e protocolo. As medidas utilizadas foram: peso, consumo de ração e de água e testes semanais de ingestão e preferência de líquido. Os resultados encontrados mostram que o protocolo de estressores diminuiu o peso dos sujeitos tanto para o grupo que passou pela manipulação (MP) quanto para o que passou apenas pelo protocolo de estressores (P). O consumo de alimento e água também apresentou resultados semelhantes para os Grupos P e MP: todos apresentaram aumento na ingestão de água e diminuição do consumo de ração durante o protocolo. Para os testes de consumo e preferência de líquido, tanto o Grupo P quanto o MP apresentaram oscilação de preferência no período sem estressores e aumento da ingestão de sacarose durante as semanas de submissão ao protocolo, ou seja, não produziram anedonia. Os resultados permitem afirmar que o grupo que passou pelo procedimento de manipulação neonatal separados da mãe por 15min não apresentou diferença em comparação com o grupo que não foi manipulado, principalmente em relação aos testes de ingestão e preferência, quando submetidos ao CMS.

Palavras chave: *Chronic Mild Stress*, Modelo Experimental, manipulação neonatal, separação materna, Análise do Comportamento

Lacerda, L.G. (2013). *Chronic Mild Stress (CMS): um estudo sobre a interação entre manipulação neonatal e submissão ao protocolo de estressores na vida adulta*. Dissertação de mestrado. Programa de Estudos Pós-Graduados em Psicologia Experimental: Análise do Comportamento. Pontifícia Universidade Católica de São Paulo. 52 págs.

Thesis Adviser: Fátima Regina Pires de Assis

Research Program: Basic Processes in Behavior Analysis

ABSTRACT

Chronic Mild Stress (CMS) an experimental animal model of anhedonia induced by exposing the rats to a protocol of chronic stress for a long period of time. At the Laboratório do Programa de Pós Graduação em Psicologia Experimental: Análise do Comportamento, a research line about CMS and its relation with the operant behavior has been developed since 2001, as in Pereira (2009). Unlike other studies conducted in this laboratory, Pereira (2009) did not observe sucrose intake and preference reducing (anhedonia) along stressors. One pointed hypothesis was the neonatal handling was a responsible variable for that. The goal of this study was to investigate whether the neonatal handling alters the fluid intake and preference on rats that were submitted to the stressors protocol (CMS) during the adult phase. Three groups were divided among experimental conditions: 1) neonatal handling, 2) protocol and 3) neonatal handling and protocol. The used measures were: weight, ration and water intake and weekly tests over intake and fluid preference. Results found show that stressors protocol reduced weight of subjects from the manipulation group (MP) as for the ones from only stressors protocol group (P). Food and water intake also presented similar results for Groups P and MP: all subjects presented water intake enhance and ration intake reducing during protocol. For fluid intake and preference tests, both Group P and MP presented preference oscillation at no stressors period and sucrose intake enhance during protocol submission weeks, that means, they did not produced anhedonia. Results allow to assure that the group submitted to maternal manipulation with 15min mother's separation did not show any difference in comparison to the nohandling group, specially related to preference and intake tests, when submitted to CMS.

Key words: *Chronic Mild Stress*, Experimental Model, neonatal handling, maternal separation, Behavior Analysis

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	01
<i>Chronic Mild Stress</i>	01
CMS e o Laboratório de Psicologia Experimental da PUCSP	05
Manipulação neonatal	10
MÉTODO	18
Sujeito	18
Ambiente e materiais	18
Equipamento	18
Procedimento	19
Fase pré-natal	19
Fase neonatal	19
Fase adulta	21
RESULTADO E DISCUSSÃO	25
Peso corporal dos sujeitos	25
Consumo de ração e água	32
Teste de ingestão e preferência de líquidos	37
CONSIDERAÇÕES FINAIS	49
REFERÊNCIAS	52

LISTA DE FIGURAS

<i>Figura 1.</i> Peso corporal de todos os sujeitos do experimento. A primeira linha representa o período em que se iniciou a restrição de água a 85% do peso <i>ad lib</i> , e as duas linhas pontilhadas indicam, respectivamente, o início e fim do protocolo de estressores-----	25
<i>Figura 2.</i> Peso corporal do sujeito controle, a partir dos dois meses de vida até o fim do experimento. A primeira linha representa o período em que se iniciou a restrição de água a 85% do peso <i>ad lib</i> .-----	27
<i>Figura 3.</i> Peso corporal dos sujeitos do Grupo M, a partir dos dois meses de vida até o fim do experimento. A linha representa o período em que se iniciou a restrição de água a 85% do peso <i>ad lib</i> . -----	28
<i>Figura 4.</i> Peso corporal dos sujeitos do P, a partir dos dois meses de vida até o fim do experimento. A primeira linha representa o período em que se iniciou a restrição de água a 85% do peso <i>ad lib</i> . As duas outras linhas tracejadas correspondem, respectivamente, ao início e fim do protocolo de estressores. -----	29
<i>Figura 5.</i> Peso corporal dos sujeitos do MP, a partir dos dois meses de vida até o fim do experimento. A primeira linha representa o período em que se iniciou a restrição de água a 85% do peso <i>ad lib</i> . As duas outras linhas correspondem, respectivamente, ao início e fim do protocolo de estressores.-----	30
<i>Figura 6:</i> Média semanal do consumo de água e alimento na gaiola viveiro do primeiro ao último teste para o sujeito controle C10 -----	32
<i>Figura 7.</i> Média semanal do consumo de água e alimento na gaiola viveiro do primeiro ao último teste para o Grupo M.-----	33
<i>Figura 8:</i> Média semanal do consumo de água e alimento na gaiola viveiro do primeiro ao último teste. As linhas verticais pontilhadas representam, respectivamente, o início e o fim do protocolo de estressores.-----	34
<i>Figura.9:</i> Média semanal do consumo de água e alimento na gaiola viveiro do primeiro ao último teste. As linhas verticais pontilhadas representam o início e o fim do protocolo respectivamente.-----	35
<i>Figura 10:</i> Ingestão e preferência de líquidos aferidos nos testes semanais para o sujeito controle C10.-----	38
<i>Figura 11:</i> Ingestão total de líquido nos testes semanais e média do consumo de sacarose pelo sujeito C10.-----	38
<i>Figura 12.</i> Ingestão e preferência de líquidos aferidos nos testes semanais para os sujeitos do Grupo M.-----	40

<i>Figura 13.</i> Ingestão total de líquidos aferidos nos testes semanais e a média de ingestão de sacarose para os sujeitos do Grupo M.-----	40
<i>Figura 14.</i> Ingestão e preferência de líquidos aferidos nos testes semanais para os sujeitos do Grupo P. As duas linhas verticais pontilhadas correspondem, respectivamente, ao início e fim do protocolo de estressores.-----	43
<i>Figura 15.</i> Ingestão total de líquidos aferidos nos testes semanais e a média de ingestão de sacarose para os sujeitos do Grupo P. As duas linhas verticais pontilhadas correspondem, respectivamente, ao início e fim do protocolo de estressores -----	43
<i>Figura 16.</i> Ingestão e preferência de líquidos aferidos nos testes semanais para os sujeitos do Grupo MP. As duas linhas verticais pontilhadas correspondem, respectivamente, ao início e fim do protocolo de estressores.-----	43
<i>Figura 17.</i> Ingestão total de líquidos aferidos nos testes semanais e a média de ingestão de sacarose para os sujeitos do Grupo MP. As duas linhas verticais pontilhadas correspondem, respectivamente, ao início e fim do protocolo de estressores-----	45

LISTA DE TABELAS

<i>Tabela 1.</i> Experimentos realizados no laboratório de Psicologia Experimental da PUCSP-----	06
<i>Tabela 2.</i> Experimentos de manipulação -----	17
<i>Tabela 3.</i> Grupo de sujeitos e condições experimentais -----	24
<i>Tabela 4.</i> Protocolo de estressores-----	23

Modelos animais de psicopatologia correspondem a modelos experimentais estudados em situação controlada de laboratório que investigam sistematicamente variáveis relevantes para a compreensão do comportamento humano. São análogos experimentais de fenômenos humanos a partir de estudos com animais (Abranson, Seligman, 1977, citado por Pereira, 2009). Entre os modelos existentes, há os específicos para o estudo da depressão, como o desamparo aprendido e os modelos de anedonia.

Por anedonia, entende-se uma alteração comportamental geralmente presente na depressão que é definida como diminuição na capacidade para experienciar prazer, ou seja, “diminuição da capacidade de emitir respostas a recompensas” (Willner, 1997a, p. 320).

Chronic Mild Stress (CMS)

Um exemplo de modelo de estudo de anedonia é o *Chronic Mild Stress (CMS)*. Segundo Willner (1997b), o CMS é um modelo experimental em que ratos são expostos sequencialmente, durante semanas, a variados estressores chamados de suaves ou moderados. Os estressores são chamados de suaves ou moderados, pois isoladamente não são considerados aversivos, mas quando apresentados em conjunto, adquirem propriedades aversivas pela cronicidade com que são apresentados (os estressores serão posteriormente descritos neste trabalho). O efeito do regime de estressores, a anedonia, é medido pelo decréscimo do consumo de solução adocicada palatável.

O modelo de CMS é um modelo animal experimental que pode ser considerado válido. Willner (1997a), a partir da revisão de artigos publicados sobre replicação desse modelo, justifica sua validade por tais razões 1) mudanças comportamentais são revertidas pelo tratamento crônico, por meio de uma ampla variedade de antidepressivos; 2) praticamente todos os sintomas da depressão que são demonstráveis, têm sido demonstrados por esse modelo e 3) o CMS causa um decréscimo geral nas repostas a recompensas, comparáveis com a anedonia.

Além disso, nesse artigo de 1997, Willner discutiu três tipos de validade do modelo: a validade de construção teórica (*construct validity*), a validade aparente (*face validity*) e a validade preditiva (*predictive validity*). A primeira corresponde à construção teórica, na qual é possível dizer que o CMS possui validade de construção teórica já que há correspondência entre a racional teórica e o queé produzido em

laboratório. Ou seja, o CMS causa diminuição nas respostas a recompensas (anedonia). Apenas a mudança do peso corporal observada em um dos estudos não pôde ser replicada em outros laboratórios (Willner, 1997a).

O segundo tipo, a validade aparente (*face validity*) relaciona-se à semelhança entre o modelo estudado e os sintomas aparentes da depressão, como mudanças comportamentais em animais expostos ao CMS. Entre essas mudanças estão a diminuição nos comportamentos sexuais, agressivos e investigativos, além de diminuição na atividade motora, distúrbio de sono, entre outros, que são aparentemente sintomas da depressão e que são produzidos pelo CMS (Willner, 1997a).

O terceiro tipo, a validade preditiva à qual o CMS atende, diz respeito às predições que podem ser feitas no laboratório e sua correspondência às predições reais. Uma grande variedade de medicamentos antidepressivos reverte o efeito do CMS, aumentando a capacidade de respostas à recompensa. Assim, é possível, através do CMS, fornecer base para desenvolver medicamentos antidepressivos com mais confiança (Willner, 1997a).

Além da validade, Willner (1997a) discutiu sobre a confiabilidade do modelo. A partir da revisão de artigos, segundo o autor, é possível dizer que o CMS é um modelo confiável, visto que ao ser replicado com em vários laboratórios obteve resultados semelhantes.

No entanto, em algumas replicações utilizando o mesmo procedimento, os resultados encontrados não produziram os efeitos esperados, isto é, não produziram decréscimo na ingestão de sacarose. Willner (1997a) sugere oito hipóteses para explicar esse fato: 1) diferença na linhagem dos ratos, 2) diferença de descendência (hereditariedade) pode gerar diferença nos efeitos do CMS, 3) diferença nas concentrações de sacarose (a concentração ideal varia dependendo da linhagem), 4) alterações no tempo da fase claro/escuro podem também ter interferido nos resultados, quando os testes eram feitos na fase clara não havia alteração, 5) o tempo em que os sujeitos eram separados, ficavam sozinhos na caixa também influencia, pois a interação social durante o CMS é um elemento importante no procedimento do protocolo, 6) o peso corporal dos sujeitos também pode ter interferido, pois foi notado em alguns experimentos que, quanto maior a perda de peso, menor era diminuição da preferência pela solução de sacarose, 7) medidas diferentes dos efeitos do protocolo foram utilizadas, que não a medida de ingestão e preferência de líquido, como a estimulação intracraniana para investigar a anedonia, podendo haver diferença nos resultados, 8)

procedimento de CMS difere em detalhes de laboratório para laboratório em relação à conveniência e logística.

Os resultados diferentes do esperado são fonte de críticas ao modelo, como visto em experimentos descritos em 1997 no volume do *Psychopharmacology* (1997) 134. No entanto, Willner (1997a) responde a essas críticas afirmando que o CMS é um modelo válido e dentre os modelos animais de depressão é um dos mais confiáveis, pois 1) mudanças comportamentais são revertidas pelo tratamento crônico, por meio de uma ampla variedade de antidepressivos; 2) praticamente todos os sintomas da depressão que são demonstráveis, têm sido demonstrado por esse modelo e 3) o CMS causa um decréscimo geral nas repostas a recompensas, comparáveis com a anedonia.

Além disso, em 2005 Willner publicou uma revisão de literatura apresentando dezenas de experimentos que conseguiram replicar o CMS, em contraste a um número bem menor de experimentos que não obtiveram os resultados de anedonia esperados, e que foram denominados por Willner (2005) de “anômalos”. O autor afirma que uma possibilidade para esses resultados é que o método aplicado não foi fidedigno ao CMS aplicado em 1987 e, além disso, enumera possíveis variáveis que podem estar relacionadas a essas diferenças apresentadas entre os laboratórios como: gênero, idade, condições de criação, hora do dia em que foi realizado o teste, estado endocrinológico, estado nutricional, padrões de expressão genética e linhagem.

O *Chronic Mild Stress*, segundo Willner, Towell, Sampson, Sophokleous, Muscat, (1987), surgiu a partir de uma série de estudos feitos por Katz e colaboradores publicados em 1982. Nesses estudos, ratos eram expostos sequencialmente a uma variedade de estressores considerados severos, como choques elétricos imprevisíveis, imersão/nado em água gelada, pinçada na cauda, entre outros. A anedonia era avaliada por mudanças comportamentais no desempenho em campo aberto e mudanças hormonais, além de mudanças no consumo de água pura e água com sacarose ou sacarina. Após semanas de submissão aos estressores, o uso de antidepressivos específicos revertia o efeito das falhas no desempenho de campo aberto e as mudanças hormonais produzidas pela submissão aos estressores, isto é voltavam à condição anterior ao protocolo (Willner, et al 1987; Willner, 1997a).

A partir desses achados, Willner, et al (1987) propuseram um estudo semelhante aos de Katz de 1982, porém com algumas modificações: 1) redução da severidade dos estressores para aproximação do modelo da vida real 2) uso de duas garrafas de teste de ingestão, ao invés de uma, para avaliar também a preferência, além

do consumo total de líquido 3) testes semanais durante os estressores para melhor acompanhamento dos efeitos 4) administração de um antidepressivo também para avaliar “reversão” da ingestão e da preferência 5) investigação do nível de glicose no sangue para verificar se mudanças no consumo de glicose decorriam de diferentes níveis de glicose no sangue.

Foram realizados quatro experimentos com ratos da linhagem Lister, nos quais os estressores mudavam de acordo com o experimento. Nos Experimentos 1 e 4, o protocolo de estressores era formado por a) restrição de água e comida; b) iluminação contínua; c) inclinação da gaiola em 30°; d) outro sujeito na gaiola (agrupamento); e) gaiola suja e f) exposição à temperatura reduzida a 10°. Nos Experimentos 2 e 3, foram acrescentados, além dos estímulos do Experimento 1 e 4 g) barulho branco intermitente; h) luz estroboscópica; i) exposição a uma garrafa vazia após período de privação de água; j) acesso restrito à comida; l) cheiro novo; m) presença de objeto estranho à caixa (de madeira ou plástico). Todos os experimentos tinham sujeitos controle que não foram submetidos ao protocolo (Willner, et al 1987).

Houve também alteração na intensidade dos estressores (no Experimento 2, os estressores tiveram intensidade aumentada gradualmente) e no tempo total de exposição: Experimento 1, cinco semanas; Experimento 2, seis semanas e Experimento 3, nove semanas. No Experimento 4 não foi especificado o número de semanas.

Os resultados encontrados por Willner, *et al* (1987), no que diz respeito à ingestão e preferência de líquidos testados, foram que todos os sujeitos submetidos ao protocolo de estressores diminuíram a ingestão da substância de sacarina e de sacarose durante a exposição ao protocolo. Para exposição de água, os níveis de consumo mantiveram-se constantes em relação ao consumo antes do protocolo. Ou seja, ratos expostos cronicamente a uma variedade de estressores imprevisíveis apresentaram redução no consumo e na preferência da substância doce (solução de sacarina ou sacarose). Essa ingestão em um nível menor manteve-se por duas a quatro semanas após o término do protocolo de estressores.

No que diz respeito ao uso de antidepressivo tricíclico, nos Experimentos 2 e 3, foi encontrado que após a terceira semana do protocolo de estressores, houve recuperação dos níveis iniciais de ingestão e de preferência. Os sujeitos que receberam placebo a ingestão e preferência de solução de sacarose mantiveram-se reduzidas.

Para os sujeitos em que foi testada a solução salina, o regime de estressores não afetou a ingestão.

CMS e o Laboratório de Psicologia Experimental da PUCSP

Alguns estudos sobre o CMS têm sido desenvolvidos no Laboratório de Psicologia Experimental: Análise do Comportamento da PUC-SP (PEXP) desde 2001, buscando investigar os possíveis efeitos da exposição crônica a alterações ambientais (estímulos moderadamente aversivos) em mudanças comportamentais, como os de Thomaz (2001), Dolabela (2004), Rodrigues (2005), Cardoso (2008), Pereira (2009), além de duas teses de doutorado, Oliveira (2009) e Thomaz (2009), de outro programa de Pós Graduação cujos dados também foram coletados no laboratório do PEXP da PUC-SP.

Quanto aos objetivos, os três primeiros estudos (Thomaz, 2001; Dolabela, 2004; Rodrigues, 2005) verificaram a interação entre o protocolo de estressores e o valor reforçador de água e da água com sacarose, medidos em sessões operantes em que respostas de pressionar a barra produziam um dos líquidos como consequência. Utilizaram esquemas concorrentes de Razão fixa FR-FR de mesmo valor. Eles também mantiveram os testes semanais de ingestão e preferência de líquido como medida do CMS. As sessões operantes para Thomaz (2009) foram feitas antes e após o protocolo, enquanto os outros três experimentos tiveram grupos que passaram também pela condição operante durante o protocolo de estressores. O trabalho de Cardoso (2008) seguiu uma linha semelhante, porém utilizou esquemas de VI-VI.

O trabalho de Oliveira (2009) objetivou avaliar os efeitos da exposição ao regime de estressores sobre a atividade geral de ratos, e o de Thomaz (2009) buscou investigar os possíveis efeitos da exposição a condições operantes usando como reforçadores alimentos e acesso à roda de atividades, reforçadores diferentes dos utilizados nos testes de consumo semanais.

O objetivo de Pereira (2009) foi investigar 1) como diferentes esquemas de privação afeta as medidas utilizadas para verificar o efeito do CMS, como alteração no peso, consumo de água e alimento, ingestão e preferência por sacarose e taxa de respostas de pressão à barra e 2) os possíveis efeitos das sessões operantes nos diferentes arranjos de protocolo de estressores que foram manipulados (protocolo completo, protocolo sem privação, e apenas privação sem o restante do protocolo).

A Tabela 1 mostra diferenças e semelhanças nos procedimentos realizados nesses estudos

Tabela 1: Experimentos realizados no Laboratório de Psicologia Experimental da PUCSP

	Thomaz (2001)	Dolabela (2004)	Rodrigues (2005)	Cardoso (2008)	Pereira (2009)	Oliveira (2009)	Thomaz (2009)
Sessões Operantes	Esquema FR: Antes e após CMS	Esquema FR: Antes e após / Antes durante e após CMS	Esquema FR: Antes e após / Antes, durante e após CMS	Esquema VI: antes e após / Antes, durante e após CMS	Esquema FR: Antes, durante e após o CMS	Esquema FR: Antes / durante / após	Esquema FR: Antes / durante / após
Concentração de SAC	Testes 2%	Testes 8%	Testes 8%	Testes 2% e 8%	Testes 2%	Testes 2%	Testes 2%
	Operantes 8%	Operantes 8%	Operantes 8%	Operantes 8%		Operante: ração	Operante: roda de atividade e alimento
Nº de testes	4 antes; 6 durante; 3 depois	12 antes; 6 durante; 3 depois	16 antes; 6 durante; 3 depois	4 antes; 6 durante; 3 depois	12 antes; 6 durante; 3 depois	3 antes; 6 durante; 3 depois	4 antes; 6 durante; 3 depois
Raça		Mc Cowley	Mc Cowley	Wistar	Wistar	Wistar	Wistar

Quanto aos estressores, Thomaz (2001), Dolabela (2004), Rodrigues (2005) seguiram o protocolo baseado em Willner *et al* (1987), com modificações como por exemplo, não foi utilizado o estressor redução de temperatura nem aumento na intensidade dos estressores e a privação de água foi constante, a fim de manter o peso dos sujeitos entre 80 e 85% do peso *ad lib*. Cardoso (2008), Pereira (2009), Oliveira (2009) e Thomaz (2009) utilizaram estressores semelhantes ao dos estudos anteriores do Laboratório de Psicologia Experimental da PUC, porém a privação de água seguiu o protocolo de Willner *et al* (1987), usando um esquema de privação de água apenas durante o protocolo de estressores (de 84 horas semanais) e antes dos testes e das sessões operantes.

Esses estudos avaliaram os resultados a partir das medidas a) teste de ingestão e preferência de líquido b) peso corporal c) consumo de água e ração na gaiola viveiro (a partir de Rodrigues, 2005) d) desempenho operante: número de respostas emitidas em barras que dão acesso à água e água com sacarose ou alimento (Oliveira, 2009 e Thomaz, 2009) ou acesso roda de atividade (Thomaz, 2009 e Oliveira, 2009).

Em relação aos testes semanais de consumo e preferência de líquidos, os estudos de Thomaz (2001), Dolabela (2004), Rodrigues (2005) apresentaram resultados semelhantes e que estão de acordo com Willner *et al* (1987). Thomaz (2001) revelou que, para o grupo submetido apenas ao protocolo de estressores, sem passar pelas sessões operantes, a ingestão total de líquido durante e após o protocolo diminuiu, comparada à ingestão anterior à submissão ao mesmo. A preferência por sacarose também diminuiu, porém continuou maior comparada ao consumo de água pura. Para

os sujeitos, que além de terem passado pelo protocolo, foram submetidos a sessões operantes, também houve diminuição no consumo total durante a exposição ao protocolo, porém após os estressores e com o reinício das sessões de esquemas concorrentes, a preferência por sacarose e o consumo total de líquido aumentaram novamente.

Assim, Thomaz (2001) salientou que o treino operante parece ter sido determinante na recuperação dos valores de ingestão e preferência. Dolabela (2004) encontrou o mesmo resultado, acrescentando que os sujeitos que passaram pelas sessões operantes também durante o protocolo de estressores, voltaram aos níveis iniciais de forma mais rápida do que os que passaram por sessões operantes somente antes e após o protocolo de estressores. Dados que também foram encontrados por Rodrigues (2005).

Com relação ao peso, nos três estudos (Thomaz, 2001; Dolabela, 2004 e Rodrigues, 2005), os sujeitos não submetidos às sessões operantes, não recuperaram totalmente seu peso. Os sujeitos submetidos às sessões operantes antes, durante e após o protocolo de estressores tiveram recuperação mais rápida do que para os sujeitos submetidos às sessões antes e depois do protocolo.

Os outros estudos realizados a partir de 2008, Cardoso (2008), Pereira (2009), Oliveira (2009) e Thomaz (2009) divergem em alguns aspectos dos estudos realizados anteriormente.

Em Cardoso (2008), os resultados referentes ao peso, corroboram os estudos anteriores (2001, 2004 e 2005), pois todos os sujeitos diminuíram de peso durante os estressores, assim como os resultados referentes aos testes de ingestão e preferência de líquido do grupo que passou apenas pelo protocolo de estressores. No entanto, para os sujeitos que passaram pela condição operante em esquema concorrente de VI, os efeitos que antes haviam sido produzidos pela exposição ao CMS parecem ter sido invertidos: houve um aumento no consumo total de líquidos e menor oscilação na preferência comparada com o consumo antes e depois da submissão. Cardoso (2008) afirma que o esquema em VI permitiu ao sujeito maximizar a obtenção de reforçadores nas duas barras, o que indica que eles alternaram mais entre as barras.

Para Oliveira (2009), apenas o sujeito que passou somente pelo protocolo de estressores apresentou redução na ingestão de líquido e na preferência pela solução de sacarose. Todos os outros sujeitos que passaram pela condição operante apresentaram valores irregulares e aumento na ingestão de sacarose comparado aos valores de antes do protocolo. Oliveira (2009) questiona os testes semanais como medida para anedonia,

visto a redução de preferência pela sacarose que era esperada, se contrapôs ao aumento ingestão de sacarose nestes testes.

O questionamento sobre a efetividade dos testes semanais como medida de anedonia para sujeitos que passaram por outras condições que não somente o protocolo de estressores é mais bem sustentado pelo resultado de outra medida: a atividade geral dos sujeitos na caixa de atividades. Oliveira (2009) mostra que para os sujeitos que passaram pelas sessões operantes, apesar de não ter havido redução na ingestão de solução de sacarose durante os testes, houve uma redução na ingestão de água e no número de respostas de pressão à barra durante os estressores. Além disso, a atividade na roda aumentou durante os estressores, fazendo com que o autor afirmasse que a exposição ao protocolo parece modificar a atividade geral dos sujeitos na caixa de atividade e sugerisse que o aumento da atividade na roda poderia ser produto da restrição alimentar que os sujeitos foram expostos nesse período.

Os resultados de Thomaz (2009) também mostraram que apenas o sujeito que passou somente pelo protocolo de estressores apresentou redução no consumo de sacarose, replicando os dados de Thomaz (2001), Dolabela (2004) e Rodrigues (2005). Para todos os outros sujeitos submetidos às sessões operantes durante a exposição ao protocolo não houve diminuição no consumo, resultados que também corroboram com os estudos anteriores, afirmando que a condição operante possa ter atenuado os efeitos da submissão ao protocolo de estressores. Além disso, quanto ao desempenho operante, foi notado que uma redução na taxa de respostas (vista como diminuição do valor reforçador) atrasada.

O estudo de Pereira (2009) será mais bem detalhado, pois ele deu origem ao problema de pesquisa deste estudo. Nesse experimento foram observados as seguintes condições experimentais: 1) Condição preparatória, formada por alojamento, cuidado materno e manipulação dos sujeitos; 2) Acesso livre a alimento e água; 3) Teste de ingestão e preferência de líquidos; 4) Protocolo de estressores e 5) Sessões operantes.

A primeira etapa, condição preparatória, foi diferente dos outros estudos do Laboratório de Psicologia Experimental da PUCSP, pois os sujeitos foram acompanhados desde o cruzamento até o desmame, incluindo cuidados no alojamento (sala isolada, temperatura e ruído controlados), observação no cuidado materno (registro do número de mortes, observação da amamentação, localização e número de ninhos, entre outros) e manipulação dos sujeitos desde primeiros dias de vida. Esse último merece destaque para o presente trabalho.

Tendo o peso corporal dos sujeitos como medida, Pereira (2009) realizou pesagem de todos os sujeitos do experimento, diariamente, desde o segundo ou quinto dia de vida até o fim do experimento. Durante a aferição de peso, a mãe era separada dos filhotes e esse afastamento durava aproximadamente 20 minutos.

Esse procedimento de pesagem e consecutiva separação da mãe foi chamado pelo autor de manipulação neonatal. Os sujeitos ficavam alojados em caixas com maravalha onde permaneciam duas mães e seus filhotes. No momento da pesagem eram utilizadas duas caixas. Primeiramente as mães eram retiradas da Caixa 1 e colocadas na Caixa 2. Os filhotes eram retirados da Caixa 1 e pesados um a um, sendo imediatamente colocados, novamente na Caixa 2, junto às mães. Sendo assim, cada filhote passava um tempo diferente afastados da mãe, pois variava entre o tempo de pesagem do primeiro filhote e os 20 minutos após todos os outros filhotes serem pesados e o último filhote era retornado à caixa com a mãe. Esse procedimento durou até o desmame, quando os sujeitos foram isolados em caixas separadas. Além da separação da mãe, Pereira (2009) salienta que a própria estimulação tátil dos filhotes feita pelo experimentador desde muito antes do desmame, está incluída no que ele chama de manipulação neonatal.

Durante os 90 dias de vida, todos os sujeitos tinham livre acesso a alimento e água e a quantidade de ingestão dessas duas substâncias eram medidas, assim como seu peso que era aferido diariamente. A partir do 91º dia de vida, aproximadamente, deu-se início o procedimento de privação.

A condição de teste de ingestão e preferência de líquidos foi realizada para todos os sujeitos semanalmente, igual a todos os estudos anteriores, em que havia exposição durante uma hora de duas mamadeiras, uma contendo água e a outra água com sacarose a 2% (alguns estudos 8%), e se media a quantidade inicial e final do líquido em cada teste. Os lados das mamadeiras eram alterados a cada dia e essa condição foi realizada antes do início (12 testes), durante (seis testes) e depois do término do protocolo de estressores (três testes).

Quanto aos resultados referentes ao peso corporal e ao consumo de líquido, Pereira (2009) encontrou que a) a privação altera o peso corporal dos sujeitos; b) a privação altera o padrão de consumo de água e alimento; c) o protocolo de estressores sem a privação (incompleto) altera o peso corporal dos sujeitos, porém em menor medida que a privação; d) o protocolo de estressores sem a privação (incompleto) altera o peso corporal dos sujeitos, porém em menor medida que a privação; e) o protocolo completo é responsável pelas maiores alterações de peso e consumo de água e alimento

encontrado. Os sujeitos submetidos a sessões operantes produziram diferenças nas alterações de consumo e água e alimento apresentada por sujeitos submetidos o protocolo incompleto (sem privação).

Nos testes de ingestão e preferência de líquido, um dado que deve ser destacado é que houve um aumento na ingestão da solução de sacarose, para os grupos que passaram apenas por privação, com ou sem operante. A partir dos dados obtidos, de que a ingestão de solução de sacarose aumentara, mesmo sem o operante, Pereria (2009) levantou a hipótese de que a manipulação neonatal, sendo considerada uma situação estressora diminuiu o consumo de sacarose enquanto adultos. Diferente do que Willner aponta, que uma situação estressora diminui a ingestão de sacarose, alguns autores descritos posteriormente sustentam a hipótese de Pereira (2009).

Em relação às sessões operantes, o estudo de Pereira (2009) diferiu dos resultados encontrados nos estudos de Thomaz (2001), Dolabela (2004) e Rodrigues (2005). Os sujeitos, mesmo passando pelo protocolo de estressores, aumentaram o consumo de solução de sacarose, tanto os que passaram pelas sessões operantes, quanto os que não passaram pelas sessões operantes. A autora também levanta a possibilidade de que isso aconteceu devido a manipulação neonatal, que não foi realizada nos outros experimentos do laboratório. Era esperado que os sujeitos que não passaram pelas sessões operantes, diminuíssem a ingestão de solução de sacarose.

Assim, o estudo de Pereira (2009) apesar de não ter tido como objetivo analisar a manipulação neonatal, sugeriu que tal manipulação, necessária para que os sujeitos fossem pesados, pode ter sido uma variável relevante no consumo de líquido após o protocolo de estressores, abrindo novas frentes de estudos na linha de pesquisa do CMS.

Manipulação neonatal

Os resultados encontrados por Pereira (2009) chamam atenção no que diz respeito à hipótese de a manipulação neonatal ser uma variável capaz de inibir os efeitos do protocolo de estressores.

Existe uma vasta literatura sobre a exposição a eventos considerados aversivos nas fases iniciais da vida (fase fetal e neonatal) e seus efeitos na vida adulta. Uma parte dela diz respeito ao que se pode chamar de manipulação neonatal e às mudanças neurobiológicas e comportamentais verificadas na vida adulta.

Sobre esse assunto, Silveira, Portella, Clemente, Bassani, Tabajara, Gamro, Dantas, Torres, Lucion e Dalmaz (2004) investigaram possíveis efeitos da manipulação e estimulação tátil, durante os dez primeiros dias de vida, na ingestão de comida palatável na fase adulta. Segundo os autores, eventos no começo da vida (fatores pré natal e pós natal) de um indivíduo têm impacto no estado neuroendócrino e comportamental nos adultos. Um exemplo disso é a manipulação durante o período neonatal que produz em ratos adultos um decréscimo nas medidas que os autores chamaram de emocionais (*emotional-related*), como por exemplo, alterações bioquímicas e comportamentais (aumento na atividade e exploração em situações novas). Segundo pesquisas anteriores nas quais Silveira et al (2004) se basearam, a diminuição nos comportamentos de ansiedade na prole adulta, “está relacionada a um comportamento maternal mais satisfatório realizado pela mãe e induzido pela separação diária de curto prazo no período neonatal” (p.739), sendo a questão do tempo de separação apresentada como um fator importante relacionada ao consumo de comida na fase adulta.

Silveira et al (2004) tiveram como objetivo verificar se o que os eles chamam de manipulação isoladamente (tido como afastamento da mãe) e manipulação mais estimulação tátil durante o período neonatal interfere na ingestão de comida palatável em ratos adultos. Para isso, foram utilizados 138 ratos entre machos e fêmeas divididos por ninhadas em três grupos: 1) grupo dos não manipulados: oito ninhadas que não foram perturbados com suas mães até o desmame, 2) grupo dos que passaram somente por manipulação (afastamento da mãe sem estimulação tátil): durante os dez primeiros dias de vida, seis ninhadas eram removidos da gaiola viveiro e colocados por dez minutos em uma incubadora a 37°C, quando retornavam à suas mães e 3) grupo dos que passaram por manipulação mais estimulação tátil: sujeitos de quatro ninhadas eram removidos do seus ninhos e colocados na mão do examinador (de três a quatro filhotes por vez), onde eram “gentilmente acariciados dorsalmente da cabeça ao rabo” (p. 741) por dez minutos, também nos dez primeiros dias de vida.

Percebe-se que esses autores chamam de manipulação neonatal somente o afastamento da mãe durante determinado período de tempo, aspecto controverso em relação a outros estudos, conforme será abordado posteriormente.

As medidas utilizadas para verificar os efeitos das variáveis investigadas foram: ingestão de ração e de comida doce, e consumo de água pura, consumo de solução de glicose a 1% e solução de cloreto de sódio a 1,5% medidas na vida adulta.

Entres os resultados encontrados tem-se que não houve diferença estatística entre o peso corporal, ingestão de ração e consumo de água entre os ratos intactos, manipulados e manipulados com estimulação tátil. Também não houve diferença estatística entre os grupos para consumo de solução de glicose e solução de cloreto de sódio.

Os resultados encontrados por eles mostraram que houve diferenças na ingestão de substância doce entre ratos que os autores denominaram de estressados (manipulados e os manipulados com estimulação tátil) e os não manipulados. Os sujeitos chamados de “estressados” ingeriram maior quantidade de comida doce do que os demais sujeitos. Houve diferença entre os sexos relacionada ao consumo de comida doce após 15 meses de idade: tanto machos como fêmeas submetidos à manipulação apresentaram maior ingestão de comida doce, porém apenas os ratos machos do grupo manipulados mais estimulação tátil tiveram esse efeitos. As fêmeas do grupo que passaram por manipulação mais estimulação tátil tiveram consumo de substância doce similar ao grupo controle (não manipulado).

No que diz respeito ao consumo de comida doce, os grupos “estressados” (os manipulados e os manipulados mais estimulação tátil) demonstraram maior consumo em relação ao grupo não manipulado. Ou seja, o que os autores chamam de estresse no período neonatal leva a um aumento de apetite para essas substâncias. Os autores atribuem isso ao fato de que a manipulação neonatal leva a uma alteração no Sistema Nervoso Central envolvido na recompensa, prazer, alimentação, e respostas ao estresse, porém eles não especificaram quais foram as alterações induzidas pela manipulação neonatal no SNC.

A partir disso, diferentes definições foram identificadas em diferentes estudos, assim como há também divergências se a manipulação neonatal pode ser considerada um evento estressante e qual a interferência dessa variável em relação ao consumo de substância palatável na vida adulta. Alguns desses estudos a respeito da manipulação neonatal e separação materna com diferentes períodos de afastamento são encontrados em áreas como biologia, fisiologia, porém com procedimentos diversificados, como mostrado a seguir.

Kremmer, Martins, Teixeira, Pinheiro, Júnior, Martinez (2008) afirmam que o cuidado materno é a principal fonte de estímulos térmicos, somatossensorios, nutricionais, olfatórios, visuais e auditivos, importantes para desenvolvimento de respostas adaptativas a fatores estressantes na vida adulta. Alguns modelos

experimentais, utilizando principalmente roedores, fazem uso do procedimento de separação diária da mãe dos filhotes durante a infância, por um tempo determinado, para analisar esses efeitos. Entre os modelos experimentais, Kremer et al (2008) afirmam que existe a denominação manipulação neonatal e separação materna de curta e longa duração.

Baseados em autores como Fernandez-Teruel et al., 1991; Gonzalez et al., 1994; Gomes et al., 1999; Riul et al., 1999, entre outros, Kremer *et al* (2008) descrevem manipulação neonatal como um procedimento em que os filhotes são manuseados com estímulo tátil durante um período de três segundos a 15 minutos. A separação materna de curta duração consiste no afastamento dos cuidados maternos por períodos de 15 a 20 minutos. E separação materna por períodos superiores a 180 minutos.

No entanto, Kremer *et al* (2008), afirmam que a denominação manipulação neonatal como descrita acima passou a ser usada para o procedimento de separação de curta duração. Segundo os autores, isso se deve ao fato de que o procedimento de manipulação neonatal (tido como estimulação tátil) surgiu de dois experimentos dos anos 50, o de Wininger de 1954 e de Levine e Lewis de 1959. O primeiro demonstrou que estímulos táteis neonatais, de 10 minutos por dia durante as três primeiras semanas de vida, eram capazes de atenuar problemas comportamentais futuros em ratos albinos. E o segundo, demonstrou que apenas a separação da mãe diariamente por 3 minutos produzia efeitos similares nas ninhadas. Os resultados desses experimentos deram origem ao “paradigma da manipulação neonatal (do inglês Early Handling), também chamada na literatura de separação de curta duração, que consiste usualmente na retirada dos filhotes da caixa onde está a mãe, passando-os, todos juntos, para outra caixa durante 15 a 20 minutos” (Kremer, *et al*, 2008 p.7), ou seja separação de curta duração. O efeito desse modelo é descrito como capaz de atenuar os efeitos nocivos e severos do estresse na vida adulta. Nessa definição, não é citada estimulação tátil.

No experimento de Pereira (2009), essa foi a hipótese levantada, a de que a separação da mãe diariamente, por intervalos menores que 20 minutos, foram capazes de atenuar os efeitos do CMS na vida adulta, dado que a medida de ingestão de sacarose não sofreu alteração considerada pelo autor como significativa.

No entanto, procedimentos de separação da mãe durante o início da vida podem ter efeitos contrários aos do que os autores Kremer *et al* (2008) chamam de manipulação neonatal (ou separação de curta duração), que é o modelo chamado de Separação Materna (de longa duração). Segundo esses autores, a Separação Materna é o

procedimento em que os filhotes são separados da mãe durante intervalos longos, geralmente de quatro horas e tem por resultado, uma maior reatividade ao estresse na vida adulta. Essa separação mais duradoura priva os filhotes de cuidados maternos essenciais e aumenta os comportamentos de ansiedade em animais submetidos ao estresse na vida adulta, além de outras alterações no sistema nervoso citadas pelo autor. Segundo esses autores, o estresse de ratos na infância pode interferir no desenvolvimento do sistema nervoso relacionado ao comportamento que eles chamavam de recompensa.

Outros estudos que analisam os efeitos da manipulação neonatal sobre respostas ao estresse na vida adulta verificam a questão da redução da suscetibilidade ao estresse. Entre eles, pode ser citado o experimento de Costela, Tejedor-Real e Gibert-Rahola (1995) que buscaram determinar se ratos manipulados durante o período pós-natal estariam menos suscetíveis ao desamparo na vida adulta e se teriam menor reatividade a estressores quando adultos.

Esses autores usam o termo manipulação pós-natal descrevendo-a como remoção diária das mães da gaiola dos seus filhotes por 15 minutos durante os 20 primeiros dias de vida. Esse procedimento está de acordo com o definido por Kremer *et al* (2008) do que ele chama de procedimento de separação de curta duração.

Além disso, Costela *et al* (1995) utiliza o termo estimulação tátil como sinônimo à manipulação quando ele refere-se a efeitos específicos como diminuição da latência de respostas de fugas aos choques incontroláveis.

Nesta pesquisa (Costela *et al*, 1995) foram utilizados dois grupos denominados: manipulados e não manipulados a fim de verificar os efeitos da manipulação no período pós-nascimento. Para avaliar a suscetibilidade ao desamparo aprendido, as medidas utilizadas foram: 1) número de bolas de fezes; 2) número de falhas para fugir, 3) latência das respostas de fuga do choque e número de respostas de esquiva (respostas que evitavam o choque).

A primeira medida (número de bolas de fezes) foi utilizada para testar o que os autores denominam de emotividade. Os ratos, por volta dos 47 dias de vida, eram retirados da gaiola e colocados em campo aberto (espaço circular de um metro de diâmetro com paredes altas) em duas sessões diárias de cinco minutos de duração durante dois dias consecutivos, onde se calculavam o número de 'bolas' de fezes. Como resultado, encontrou-se que os ratos manipulados excretaram menos fezes que os não manipulados.

O número de falhas para fugir, a latência e as respostas de esquiva foram usadas para medir o desempenho de fuga e esquiva. Os animais eram colocados em uma caixa e tinham 30 tentativas para fugir. Durante três segundos de cada tentativa, uma luz era apresentada (estímulo condicionado) e os sujeitos poderiam responder para evitar o choque nesse período, se a resposta de esquiva não ocorresse, o choque era ativado. No entanto, se a resposta de esquiva ocorresse, o choque era adiado e a luz também terminava. Encontrou-se que os ratos manipulados apresentaram mais desempenho para escapar a partir da 2ª sessão e com uma latência menor.

Michael e Holtzman (2006) também usaram o procedimento de manipulação neonatal de ratos, descrevendo-o como afastamento diário da mãe com o tempo variando entre 15 minutos, uma e três horas. Esses autores buscaram investigar se o abuso de substâncias (como drogas) na fase adulta tinha relação com o estresse dias após o nascimento. Os grupos foram divididos em manipulados e não manipulados, de uma prole composta por somente um sexo ou uma prole mista, composta por sexo masculino e feminino.

O procedimento separação materna foi feito diariamente a partir do dia 1º ou 2º dia de nascimento durante as duas primeiras semanas de vida. As mães eram retiradas da gaiola e os filhotes colocados em uma incubadora a 31º durante intervalos que se alteravam randomicamente entre 15 minutos, 1 hora e 3 horas.

Os testes de preferência foram feitos a partir dos três meses de vida e duraram cinco dias consecutivos. Duas garrafas de 100 ml, uma contendo água e outra contendo solução de sacarose a 10% ficavam disponíveis por 1h e os lados da posição da garrafa eram alterados a cada dia.

Os resultados encontrados mostram que os filhotes separados da mãe consumiram maior quantidade de líquido total e solução de sacarose comparada aos filhotes não manipulados.

Em 2007, esses mesmos autores Michaels e Holtzman ampliaram o estudo de 2006, variando a concentração de sacarose entre 2,5 e 10% e utilizando machos e fêmeas como sujeitos. Michael e Holtzman (2007) objetivaram 1) determinar o impacto da separação materna (denominada como um modelo animal de estresse no começo da vida) no consumo de solução de SAC a 10 e a 2,5% em ratas mães e nos seus filhotes (machos e fêmeas) e 2) Determinar o efeito do opióide antagonista Naltrexone na ingestão de líquidos desses grupos. Os sujeitos foram submetidos à separação materna por períodos de três e seis horas durante as duas primeiras semanas de vida. Os testes

foram realizados aos 90 dias de vida, onde foram disponibilizados por 1h de acesso, duas garrafas, uma contendo água pura e outra contendo solução de sacarose, a fim de medir a preferência por um dos líquidos. Os resultados encontrados mostraram que os filhotes separados da mãe aumentaram o consumo total de líquido e a preferência por solução de sacarose, principalmente os ratos machos com concentração de SAC a 10% se comparados aos ratos que não foram separados.

A partir dos estudos descritos acima, pode-se notar que embora não haja um consenso com relação à definição de manipulação neonatal assim como seus efeitos, algumas semelhanças podem ser verificadas. O primeiro ponto em comum é que para o procedimento de manipulação neonatal é indispensável a separação da mãe dos seus filhotes diariamente durante os primeiros dias de vida (em média 15 dias). O tempo de separação diverge entre os experimentos, e parece ser a questão principal em relação aos efeitos na vida adulta. Como se tem visto, a separação de curta duração (nos experimentos de dez minutos a uma hora) pode ser responsável por diminuir os efeitos do estresse na vida adulta, tendo umas das formas de medir, a maior ingestão de uma substância (como a sacarose, por exemplo). A questão da estimulação tátil é controversa, sendo apontada em alguns estudos e não em outros, mas segundo Kremer *et al* (2008), somente a separação da mãe produz os mesmos efeitos que a estimulação tátil produziria.

A Tabela 2 resume os principais aspectos dos experimentos supracitados.

Tabela 2: Experimentos de manipulação neonatal

<i>Autor(es)</i>	<i>Tipo de manipulação</i>	<i>Tempo</i>	<i>Período</i>	<i>Grupos</i>	<i>Efeitos</i>
Silveira, et al (2004)	Separação da mãe Estimulação tátil: estimulação tátil da cabeça ao rabo	10min	10 dias	1) Não manipulados 2) Somente estimulação tátil 3) Separação mais estimulação tátil	Manipulados: maior ingestão de comida doce do que os intactos.
Costela, et al (1995)	Separação materna	15min	20 dias	1) Manipulados 2) Não manipulados	Manipulados: menor reatividade ao estresse (maior respostas de fuga e esquiva; menor número de fezes)
Michael, Holtzman (2006)	Separação materna	15min; 1h; 3h	15 dias	1) Manipulados 2) Não manipulados	Manipulados: maior ingestão de líquido / preferência por sacarose
Michael, Holtzman (2007)	Separação materna	3h; 6h	15 dias	1) Separados 2) Não manipulados	Manipulados: maior ingestão de líquido e preferência por sacarose

Desse modo, se a manipulação neonatal é capaz de aumentar a ingestão e/ou preferência de solução de sacarose na vida adulta e esta é a principal medida de anedonia para sujeitos que foram submetidos ao CMS, é possível que, em um procedimento em que a manipulação neonatal necessite ser realizada (como a pesagem desde o início da vida) ela interfira nos efeitos do protocolo de estressores?

Sendo assim, o presente estudo buscou investigar se a manipulação neonatal, entendida como separação materna durante um curto período de tempo no início da vida dos sujeitos, altera a ingestão e preferência de líquidos em ratos que passaram pelo protocolo de estressores (CMS) durante a fase adulta.

MÉTODO

Sujeitos

Foram utilizados no estudo 13 ratos machos, experimentalmente ingênuos, da linhagem *Wistar*, provenientes do Laboratório de Psicologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica de São Paulo (PUC-SP), distribuídos em três grupos: 1 sujeito controle; Grupo apenas manipulação neonatal (4 sujeitos); Grupo apenas protocolo (4 sujeitos); Grupo manipulação neonatal e protocolo (4 sujeitos).

Ambiente e materiais

Durante o experimento foram utilizadas duas salas do biotério de Psicologia do Laboratório de Experimental da PUCSP. A luminosidade era controlada por timer e temperatura foi aferida diariamente, por meio de um termômetro colocado nas salas. O ciclo luminoso foi de 12 horas claro de 12 horas de escuro, regulado por timer automático (exceto durante período de estressores que envolviam iluminação contínua).

Equipamento

Balança: equipamento da marca Filizola, com precisão de 0,5g: usada para aferir peso dos sujeitos e do alimento.

Pipeta: equipamento com precisão milimétrica, usado para medida das quantidades disponibilizadas e consumidas de água e água com sacarose.

Garrafas: usadas para ingestão de líquidos com capacidade para 250 ml feitas de plástico com bico regulador de saída de líquido.

Caixas viveiro: de material plástico e dimensões 30 cm x 45 cm x 16 cm, foram utilizadas para alojamento dos sujeitos no período do cruzamento até dois meses de vida (60 dias).

Gaiolas viveiro: gaiolas viveiro 20 cm x 30 cm x 21 cm feitos de material metálico em que os sujeitos foram alojados individualmente.

Caixa para pesagem: foram utilizadas caixas de 13cm x 19,5cm x 30cm, feitas de material plástico, usadas para pesagem no procedimento de manipulação neonatal.

Cronômetros: foram utilizados dois cronômetros digitais para marcação do tempo durante o procedimento de manipulação neonatal.

Estressores: foram utilizados os equipamentos: luz estroboscópica com regulador de velocidade de flashes; aparelho de áudio com regulador de decibéis; serragem; 8 latas redondas de alumínio com aproximadamente 5 cm de diâmetro e 1cm de altura; desodorante purificador de ar (com disparo automático em intervalos de 10min) e timer para controle do ciclo luminoso.

Sacarose: Sacarose para microbiologia Merck.

Luvas: de Latex.

Procedimento

I Fase pré-natal

Alojamento

Os ratos que originaram os sujeitos deste estudo foram alojados desde o cruzamento (do tipo monogâmico) em uma sala isolada para o experimento. O rato macho foi retirado 25 dias após, correspondente a um ou dois dias após o nascimento dos filhotes. Até os dois meses de vida, os animais, mães e filhotes machos permaneceram juntos em caixas viveiro de material plástico, forradas com maravalha. A partir dos 60 dias, foram separados e alojados individualmente em gaiolas viveiro de material metálico, sem maravalha.

A partir do alojamento individual os sujeitos que não foram submetidos ao protocolo de estressores (o sujeito controle e os quatro sujeitos do grupo que foram submetidos apenas à manipulação neonatal) foram alojados em uma segunda sala do laboratório.

II Fase neonatal (do 1º ao 22º dia de vida)

Nesta fase houve tratamento diferenciado entre o sujeito controle, o grupo que foi submetido apenas ao protocolo de estressores, o grupo que foi submetido apenas à manipulação e o grupo que foi submetido à manipulação e ao protocolo.

Sujeito controle e grupo submetido apenas ao protocolo de estressores:

Os sujeitos foram mantidos com suas mães em ninhadas individuais até o desmame. Sendo manipulados apenas durante a troca de caixas para limpeza.

Grupos submetidos à manipulação neonatal

O procedimento de manipulação neonatal será apresentado em duas etapas: 1. Cuidado materno e 2. Manipulação neonatal

1. Cuidado Materno

O procedimento a seguir foi aplicado a todos os filhotes de duas ninhadas, pois não era possível, nesta fase, fazer a distinção por sexo. Uma das ninhadas era composta por 12 filhotes, e a outra por sete, totalizando 18 filhotes. Cada ninhada, mãe com seus respectivos filhotes ficavam alojados em uma caixa viveiro.

No período neonatal foi feita observação e registro dos comportamentos classificados como cuidado da mãe em relação aos seus filhotes: amamentação, tempo que ela pegava seus filhotes e os colocava no ninho, proximidade da mãe em relação a eles.

2. Manipulação neonatal

A fase de manipulação neonatal ocorreu do 2º ao 21º dia de vida (três primeiras semanas, ou seja, até o desmame). Esse tempo foi definido por corresponder ao tempo máximo encontrado na literatura correspondente à manipulação neonatal pesquisada (Costela et al, 1995; Kremer, et al, 2008). Antes de iniciar o procedimento manipulação neonatal, a experimentadora passava as luvas de látex na maravalha da caixa.

O procedimento de manipulação neonatal consistiu em:

- a. Retirar a mãe da Caixa Viveiro 1 e colocada numa caixa pequena separada (caixa usada na pesagem);
- b. Passar a mão com luvas na maravalha onde estava a mãe com os animais;
- c. Ligar o Cronômetro 1 para controle do tempo da mãe longe dos filhotes.
- d. Retirar um filhote por vez da Caixa Viveiro 1;
- e. Manter o filhote na mão por 10s;
- f. Manter o filhote na caixa da balança por 10s, aferido pelo Cronômetro 2;

- g. Colocar o filhote na a Caixa Viveiro 2 com maravalha nova. Os filhotes eram colocados em um “ninho” feito pela experimentadora (em um dos cantos da caixa)
- h. Após 15 minutos do início da separação (aferida pelo Cronômetro 1) a mãe era colocada na a caixa viveiro onde estavam os filhotes.

O procedimento de retirada da mãe garantia que o tempo de separação materna fosse o mesmo para todos os filhotes. A cada ninhada a ser feita a manipulação, o par de luvas usados pela experimentadora era trocado.

Todos os grupos

Até os 90 dias de vida, todos os sujeitos tiveram livre acesso à água e alimento. Até esse momento, ocorreu primeiro, o desmame após aproximadamente o 22º dia de vida e a sexagem (separação machos e fêmeas) aos 30 dias de vida. Apenas os machos foram mantidos no experimento. Com aproximadamente dois meses (60 dias), os sujeitos foram isolados em caixas individuais metálicas e sem maravalha. A partir do isolamento, começou a aferição de peso diariamente e foram medidas as quantidades de água e alimento consumidos por cada sujeito. Isso aconteceu até todos os sujeitos atingirem 90 dias de vida, quando foi iniciada a privação de água a 85% do peso ad lib.

III- Fase adulta

1. Testes de ingestão e preferência de líquidos

Antes dos testes foram feitos dois pré-testes realizados em duas semanas em que uma garrafa com 100ml de solução de sacarose a 2% foi colocado por um período de 1h.

Os testes de ingestão e preferência de líquidos foram realizados semanalmente para todos os sujeitos do experimento e consistiram em expor os sujeitos, na gaiola viveiro, a duas garrafas com bico (com 250 ml de capacidade), uma contendo solução de sacarose a 2% e outra contendo água. Após uma hora, as garrafas eram retiradas media-se a quantidade inicial subtraída da quantidade final da garrafa. As garrafas eram colocadas sempre na mesma ordem: primeiro do esquerdo e depois do lado direito, sendo que a cada teste, os lados de apresentação das garrafas foram alternados (uma vez a sacarose era colocada do lado esquerdo e na vez seguinte, a água era colocada do lado

esquerdo), procedimento idêntico ao realizados em todos os estudos anteriores realizados no Laboratório de Psicologia Experimental da PUCSP. Isso foi feito até o 4º teste. No teste 5, um novo procedimento diferente dos outros estudos foi realizado. Duas experimentadoras passaram a colocar as duas garrafas de água e sacarose e água pura ao mesmo tempo, pois perceberam que a os sujeitos iam imediatamente para a primeira garrafa colocada, independente da solução contida. Colocando as duas garrafas ao mesmo, diminuía a chance de a ordem de apresentação interferir na escolha de preferência.

Os testes foram realizados antes do início (quatro testes), durante (seis testes) e após (três testes) o protocolo de estressores.

2. Protocolo de estressores

O protocolo de estressores utilizado na pesquisa foi similar ao de Willner *et al* (1987), composto pelo seguintes estressores:

- a. Inclinação da gaiola: a gaiola viveiro é inclinada em 30° para trás, permanecendo assim por 7 ou 17 horas.
- b. Luz estroboscópica: localizada no chão da sala, ligada por 2 ou 7 horas e com disparo de 300 flashes por minuto.
- c. Privação de comida: o alimento era retirado da gaiola, e os sujeitos permaneciam em privação por períodos variados de 17 a 44 horas.
- d. Privação de água: 85% do peso ad lib durante todo o experimento
- e. Gaiola suja: serragem molhada com água era colocada no chão da gaiola permanecendo suja por 17 horas.
- f. Barulho intermitente: um ruído branco intermitente de 85 decibéis era ligado permanecendo por 3 ou 5 horas.
- g. Agrupamento: dois sujeitos eram colocados juntos em uma mesma gaiola, tanto na gaiola originalmente de um, quanto na de outro, ou seja, a cada agrupamento da dupla, a gaiola de um dos sujeitos era utilizada por 17 horas.
- h. Objeto estranho na gaiola: um objeto de metal redondo de 5 cm de diâmetro e 1 cm de altura era colocado na gaiola viveiro e deixado por um período de 17 horas.

- i. Odor: um desodorante purificador de ar automático (intervalo de 10 min) era colocado na sala, ficando lá por 17 horas.
- j. Iluminação contínua: a luz da sala permanecia acesa por até 19h seguidas.
- k. Garrafa de água vazia: exposição a uma garrafa de água vazia por uma hora, após período de privação de água.
- l. Acesso restrito à comida: três pelotas de 2 gramas eram espalhadas pela gaiola viveiro do sujeito, sendo disponibilizadas aos sujeitos após um período de privação de comida.

Cada estressor era apresentado por um determinado período de tempo, alternando-se com os outros, num ciclo de sete dias, durante seis semanas. Os testes eram feitos no sétimo dia de estressores.

Delineamento experimental

O experimento consistiu em duas condições experimentais: a) manipulação neonatal e b) protocolo de estressores em que três grupos de sujeitos foram submetidos diferentemente a cada uma, ou as duas, das condições experimento e um sujeito não foi submetido a nenhuma delas, o sujeito controle usado no consumo de líquidos. A divisão dos grupos pode ser vista na Tabela 3 e a divisão do estressores na Tabela 4:

Tabela 3: Grupo de sujeitos e condições experimentais

	Número de sujeitos	Teste	Manipulação	Protocolo
Consumo de líquidos (C)	1	x		
Manipulação (M)	4	x	x	
Protocolo (P)	4	x		x
Manipulação e Protocolo (MP)	4	x	x	x

Tabela 4: Protocolo de estressores

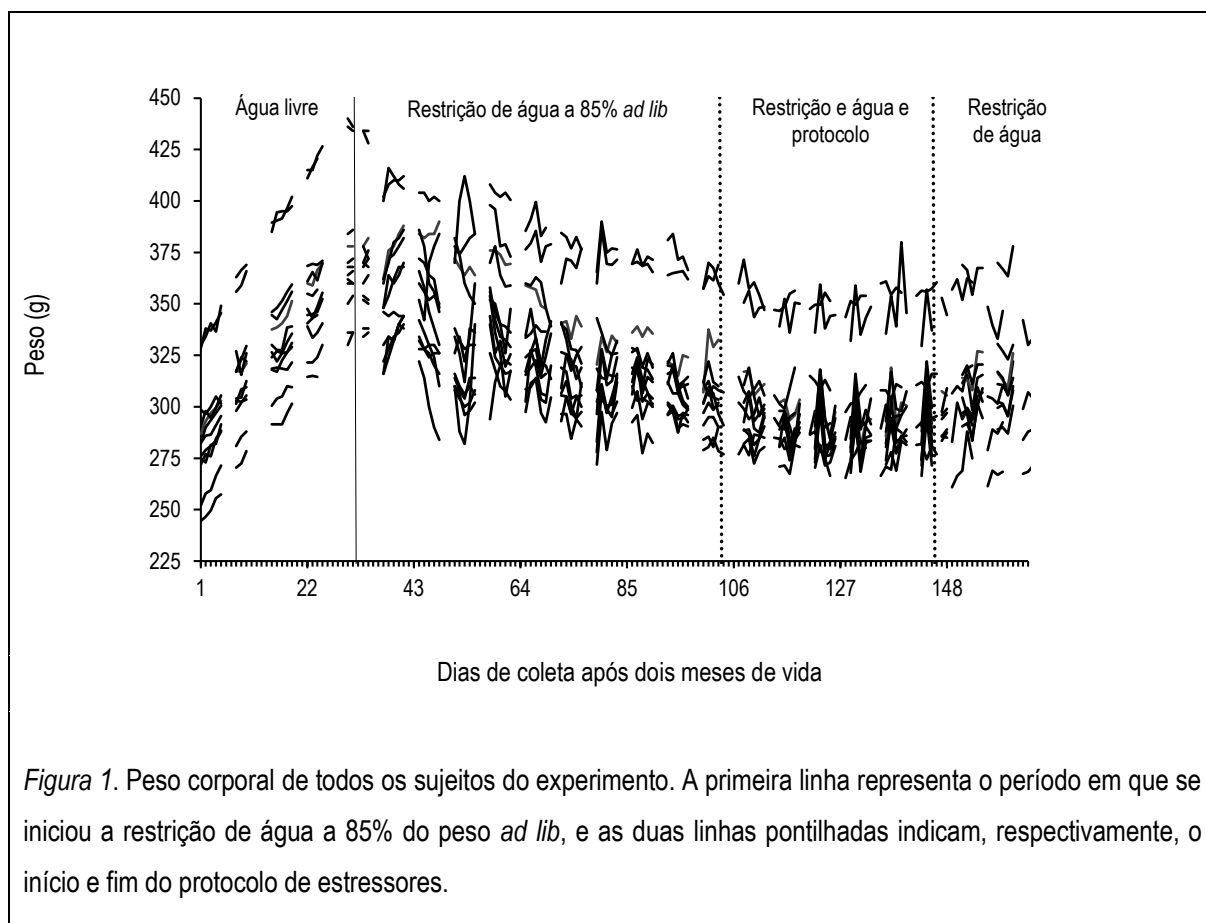
Hora	Dia 1 (4 ^{af})	Dia 2 (5 ^{af})	Dia 3 (6 ^{af})	Dia 4 (sab)	Dia 5 (dom)	Dia 6 (2 ^{af})	Dia 7 (3 ^{af})	
17h	Inclinação	Privação comida + gaiola suja	Luz contínua	Privação comida + objeto estranho	Privação comida + agrupamento	Cheiro	Privação comida + luz contínua	
18h								
19h								
20h								
21h								
22h								
23h								
	5 ^{af}	6 ^{af}	sáb	dom	seg	3 ^{af}	4 ^{af}	
00h	Inclinação	Privação comida + gaiola suja	Luz contínua	Privação comida + objeto estranho	Privação comida + agrupamento	Cheiro	Privação comida + luz contínua	
1h								
2h								
3h								
4h								
5h								
6h								
7h								
8h								
9h								
10h	Luz estroboscópica	Privação comida	Luz estrob + garrafa vazia	Privação comida + inclinação	Acesso restrito comida	Privação comida	TESTE	
11h			Acesso restrito comida					
12h			Luz estroboscópica		Barulho intermitente			Barulho intermitente
13h								
14h	Privação comida	Barulho intermitente	Luz estroboscópica	Privação comida + inclinação	Barulho intermitente	Privação comida	TESTE	
15h								
16h								

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados serão apresentados a partir dos dados de três medidas: a) peso corporal dos sujeitos b) consumo de água e alimento c) testes semanais de ingestão e preferência de líquido.

a) *Peso corporal dos sujeitos*

Os dados referentes ao peso dos sujeitos serão apresentados nas figuras a seguir. A partir dos 60 dias de vida (dois meses), todos os sujeitos foram pesados de segunda a sexta até o fim do experimento. As lacunas apresentadas no gráfico correspondem aos fins de semanas (sábado e domingo) em que a pesagem não era possível de ser realizada.

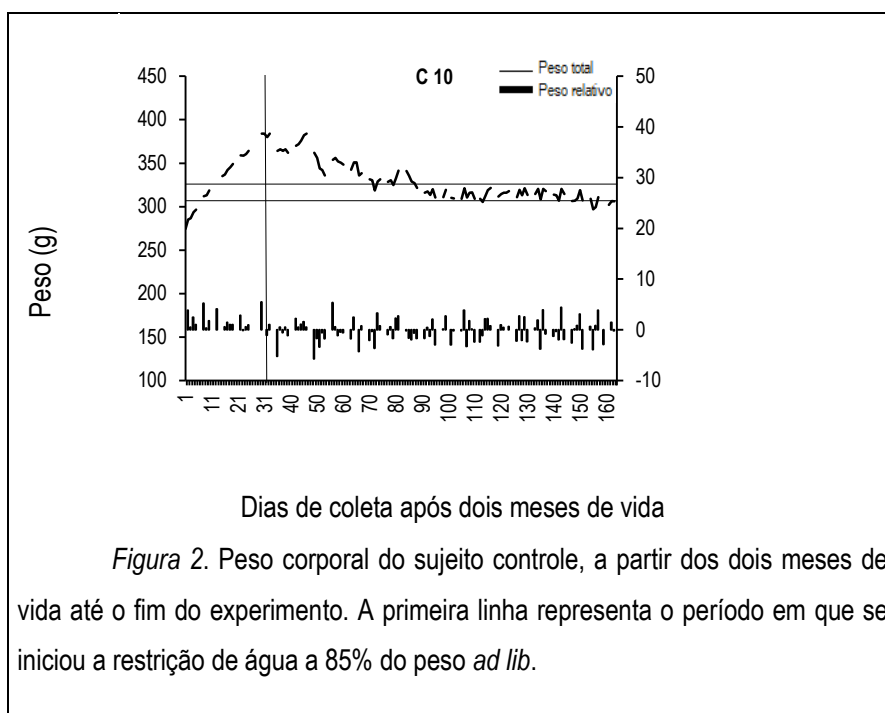


A Figura 1 mostra que, no início da pesagem, aos dois meses de vida, os pesos dos sujeitos iniciam divididos em: dois sujeitos por volta dos 250g; a maioria dos

sujeitos (nove) iniciaram a pesagem com valores entre 275 e 300g; além disso, dois sujeitos iniciaram com pesos mais elevados, acima de 325g. Todos os sujeitos possuem uma curva ascendente de aumento de peso e com pouca oscilação até o início da restrição de água.

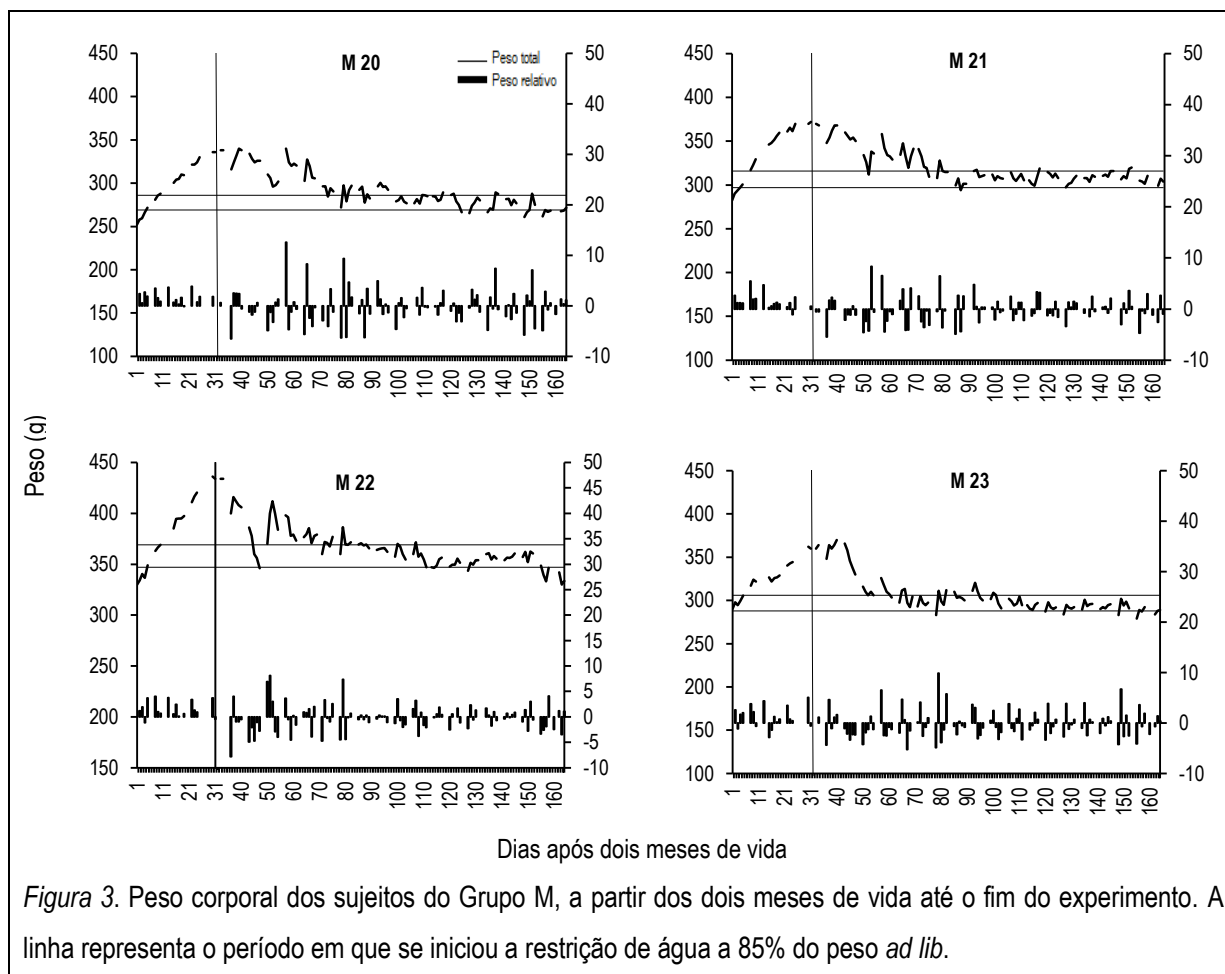
A partir do início da restrição de água (aos três meses de vida) todos os sujeitos passaram a ter um declínio no peso, com maior oscilação do peso comparado ao período de peso *ad lib* com água disponível. A linha se mantém descendente até o início do protocolo de estressores. No período que corresponde ao protocolo de estressores, os sujeitos que estavam abaixo de 300g no início da pesagem, passam a ter valores mais próximos do peso do grupo de sujeitos que pesavam entre 275 e 300g no início. Além disso, a oscilação durante o estressores é mais acentuada para maior parte dos sujeitos, provavelmente os que foram submetidos ao protocolo de estressores. Apesar dessa oscilação, de maneira geral, a tendência das curvas para todos os sujeitos acompanham o mesmo padrão. As diferenças entre grupos e entre sujeitos serão mais bem apresentadas nos gráficos individuais a seguir.

Os gráficos individuais seguirão a seguinte ordem de apresentação: sujeito controle (C10); grupo dos que passaram apenas pela manipulação neonatal e não passaram pelo protocolo de estressores (M20, M21, M22 e M23); grupo dos que passaram apenas pelo protocolo (P5, P6, P13 e P15) e o grupo dos que passaram pela manipulação durante o período neonatal e passaram também pelo protocolo de estressores na vida adulta (MP17, MP18, MP24 e MP26).



Nota-se na Figura 2 que o peso do sujeito controle aumenta até o início da privação e depois decresce, se mantendo entre 80 e 85% do peso *ad lib*. Percebe-se que a partir do início da restrição de água até o dia 81, há uma oscilação acentuada do peso do sujeito. Após esse dia, quando se inicia os testes semanais de ingestão e preferência de líquido, o peso oscila entre valores menores, porém as quedas e aumentos se dão com frequência maior por semana. Isso pode ter acontecido porque o sujeito passava por 23h de restrição total de água e ração antes dos testes.

A seguir serão apresentados os dados referentes ao peso dos sujeitos do Grupo M que passaram apenas pela manipulação neonatal.

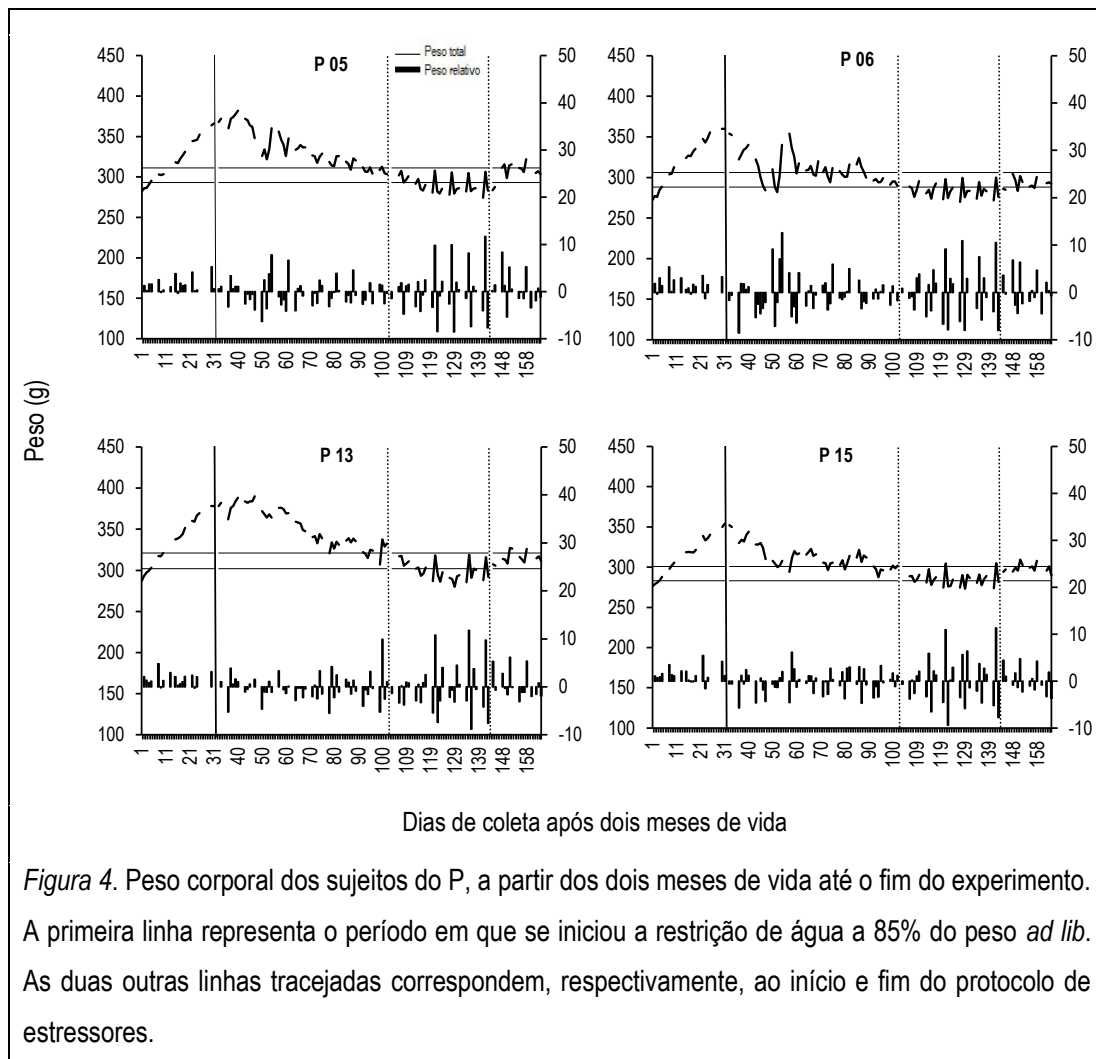


Conforme podemos ver na Figura 3, de maneira geral, a partir do 90º dia, o peso de todos os sujeitos se mantém dentro da faixa entre 80 a 85% do peso *ad lib*. Exceto o sujeito M 20, que atingiu os 85% no dia 81, porém ficou acima dessa faixa até o dia 101.

Nota-se também que para três sujeitos (M20, M22 e M23) entre os dias 121 e 141, houve uma queda de peso para abaixo de 80%. Queda de peso também vista nos últimos dias do experimento para os mesmo sujeitos (M20, M22 e M23).

Apesar de o peso dos sujeitos do Grupo M ter sido controlado quando tentou-se mantê-lo entre 80 e 85% do peso *ad lib*, a ser comparando com o sujeito controle C10, que não passou pela manipulação neonatal, nota-se que as curvas de peso do Grupo M seguem uma tendência semelhante.

Na Figura 4 a seguir, está representado o gráfico do peso corporal do grupo que passou apenas pelo protocolo de estressores, sem manipulação neonatal (P).



Todos os sujeitos desse grupo atingiram o peso entre 80 e 85% *ad lib* bem próximo ao início do protocolo de estressores, o que corresponde a aproximadamente ao dia 95. Um tempo maior, se comparado ao Grupo M.

Além disso, destaca-se a oscilação de peso acentuada durante o período do protocolo de estressores. Apesar de ter havido a tentativa de manter o peso dos sujeitos entre 80 e 85% do peso *ad lib*, todos os sujeitos tiveram o peso abaixo do valor mínimo na maior parte desse período. Nota-se também que houve recuperação do peso para valores acima de 80% no primeiro dia após o fim do protocolo de estressores (para os Sujeitos 13 e 15) e no segundo dia para os demais sujeitos, sendo que para alguns dos sujeitos, a recuperação de peso ultrapassou valores acima dos 85%.

Comparando o Grupo P ao Grupo M e ao sujeito controle, observa-se que a oscilação de peso durante o protocolo de estressores é a maior diferença entre eles. O que permite dizer, junto com a recuperação de peso após o fim do regime de estressores, que o protocolo é o principal responsável por isso.

O terceiro grupo a ser apresentado corresponde aos sujeitos que passaram pela manipulação neonatal e protocolo de estressores quando adultos, Grupo MP (manipulação e protocolo) demonstrado na Figura 5 abaixo:

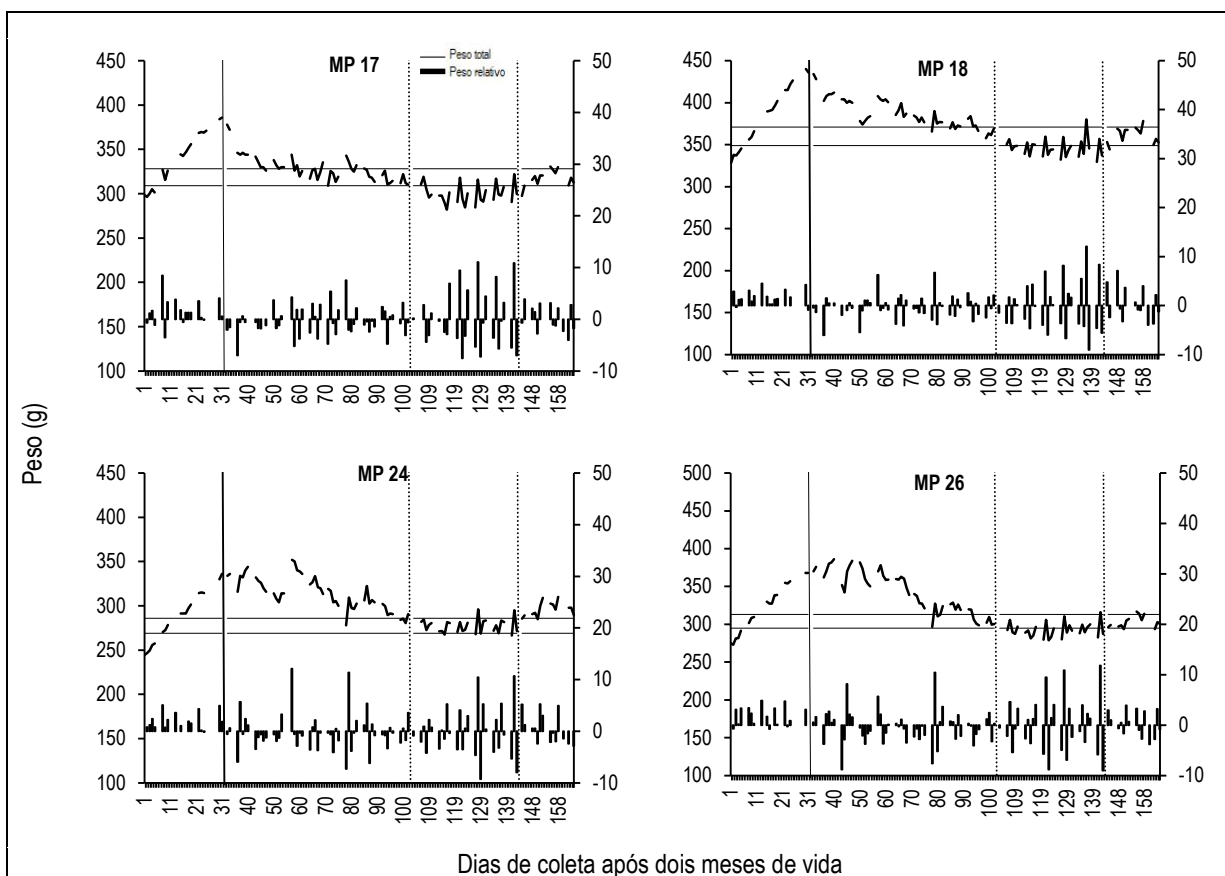


Figura 5. Peso corporal dos sujeitos do MP, a partir dos dois meses de vida até o fim do experimento. A primeira linha representa o período em que se iniciou a restrição de água a 85% do peso *ad lib*. As duas outras linhas correspondem, respectivamente, ao início e fim do protocolo de estressores.

Para os sujeitos desse grupo (MP), nota-se que o sujeito MP17 e o MP18 tem pesos iniciais entre 300 e 350g, enquanto os sujeitos MP24 e MP26 iniciam a pesagem com valores próximos de 250g. Esses valores são mais semelhantes aos pesos iniciais do grupo que também passou pela manipulação (Grupo P), e possuem valores mais elevados se comparado ao grupo que não passou pela manipulação (Grupo M).

Enquanto para o Grupo M, alguns sujeitos iniciam a pesagem com valores próximos a 325g, todos os sujeitos do Grupo P tiveram valores próximos a 275g.

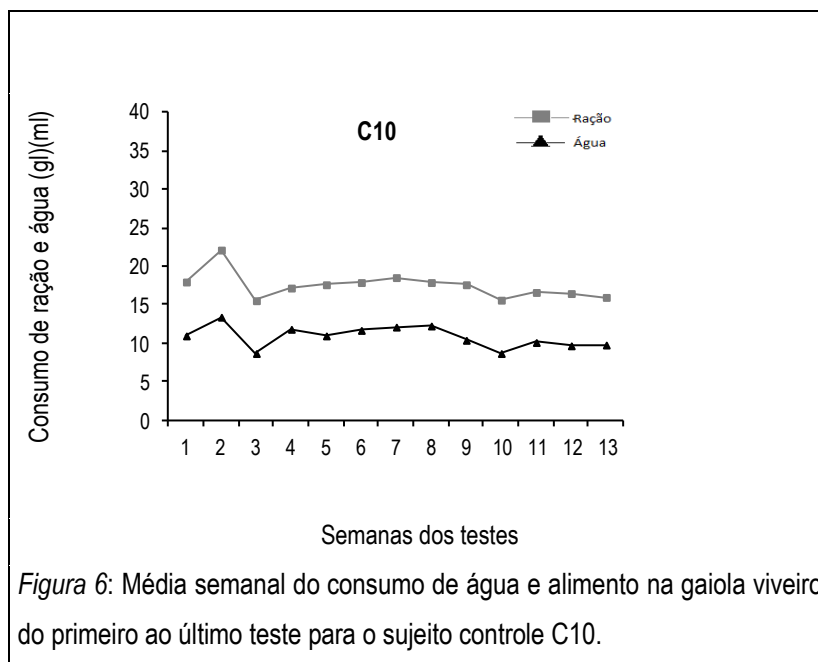
É possível notar também que, assim como o Grupo P, durante a submissão ao protocolo de estressores, a maioria dos sujeitos chegou a valores abaixo de 80%, mostrando que protocolo de estressores interfere na diminuição de peso dos sujeitos ao qual foram submetidos. A manipulação neonatal não exerceu influência sobre o peso dos sujeitos, pois já que o peso é uma medida para avaliar o efeito do protocolo de estressores, e a manipulação neonatal poderia diminuir esse efeito, era de se esperar que esse grupo (MP) sofresse menos alteração no peso durante o protocolo, do que o grupo que passou apenas pelo protocolo (P). Também não houve diferença na recuperação de peso entre o grupo que foi submetido à manipulação (MP) e o que não foi (P).

A diminuição de peso durante a submissão ao protocolo de estressores foi encontrada nos estudos de Thomaz (2001), Dolabela (2004), Rodrigues (2005) e Willner (2005), que usaram restrição de água a 85% do peso *ad lib*, assim como o presente estudo. Cardoso (2008), Oliveira (2009), Pereira (2009), apesar de usarem restrição de água diferente dos estudos anteriores, também obtiveram esse resultado. As hipóteses apresentadas nesses estudos anteriores é que a privação de água e ração durante os estressores e o próprio conjunto de estressores (incluindo a privação), como afirma Pereira (2009) são responsáveis pela maior perda de peso.

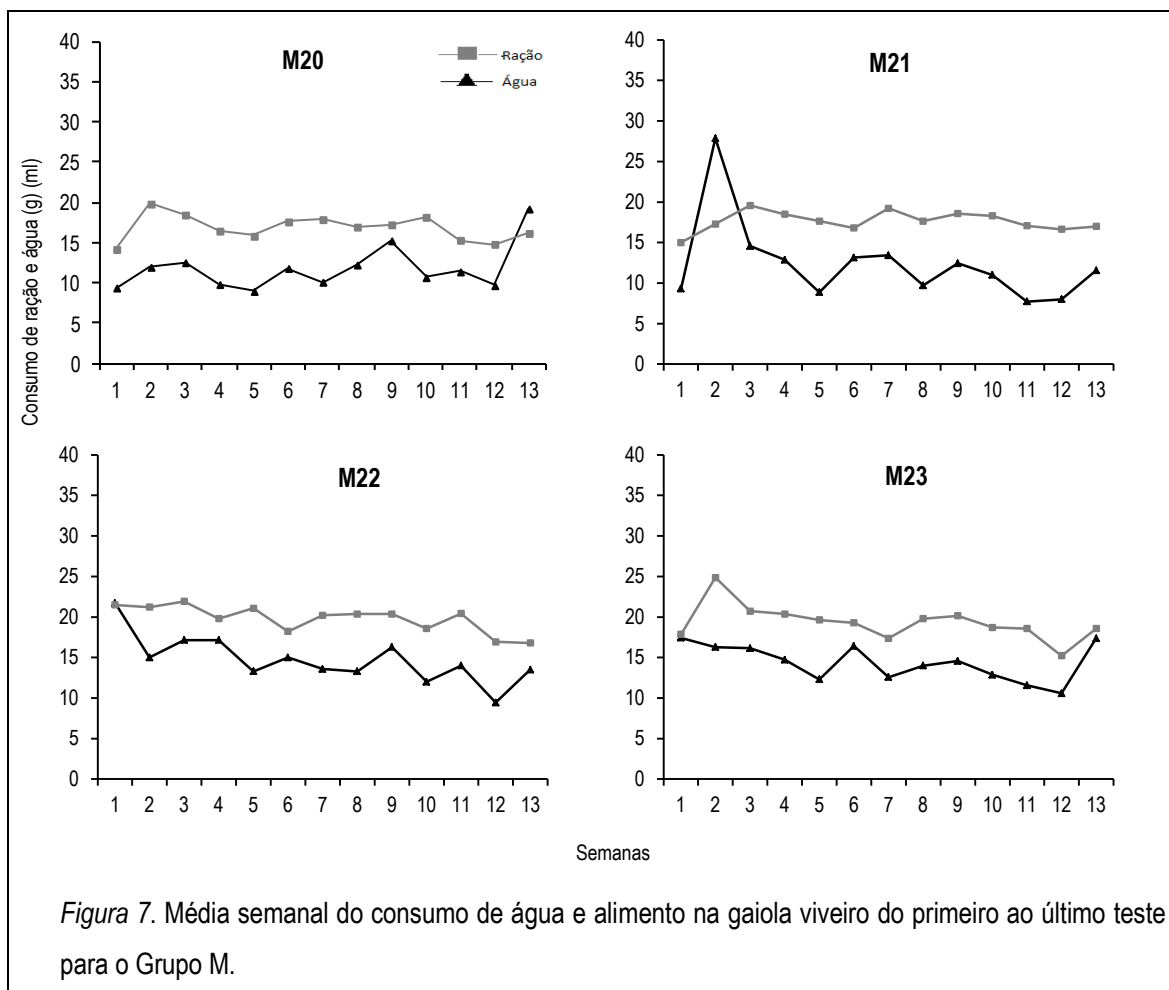
Consumo de alimento e água

O consumo de alimento e água, mostrados nas Figuras 6, 7, 8 e 9, é apresentado em valores de médias semanais durante o período dos testes de ingestão e preferência de líquido. Os resultados estão apresentados em médias porque 1) o valor diário da água colocada era duplicado nos sábados, pois no domingo não havia reposição de água. Além disso, após os testes semanais, a água só era liberada 24h após término do teste. 2) Durante o período de exposição ao protocolo de estressores, os sujeitos não tinham acesso à ração por alguns dias, para os sujeitos que passaram por essa condição. Assim, a média de consumo semanal permite uma melhor comparação entre o consumo do sujeito comparado a ele mesmo ao longo dos testes e permite também uma melhor comparação entre os outros sujeitos.

O cálculo da média foi feito somando-se o total de ração e o total de água consumidos durante a semana e ambos foram divididos por sete. Na figura abaixo se encontra o consumo para o sujeito controle C10.

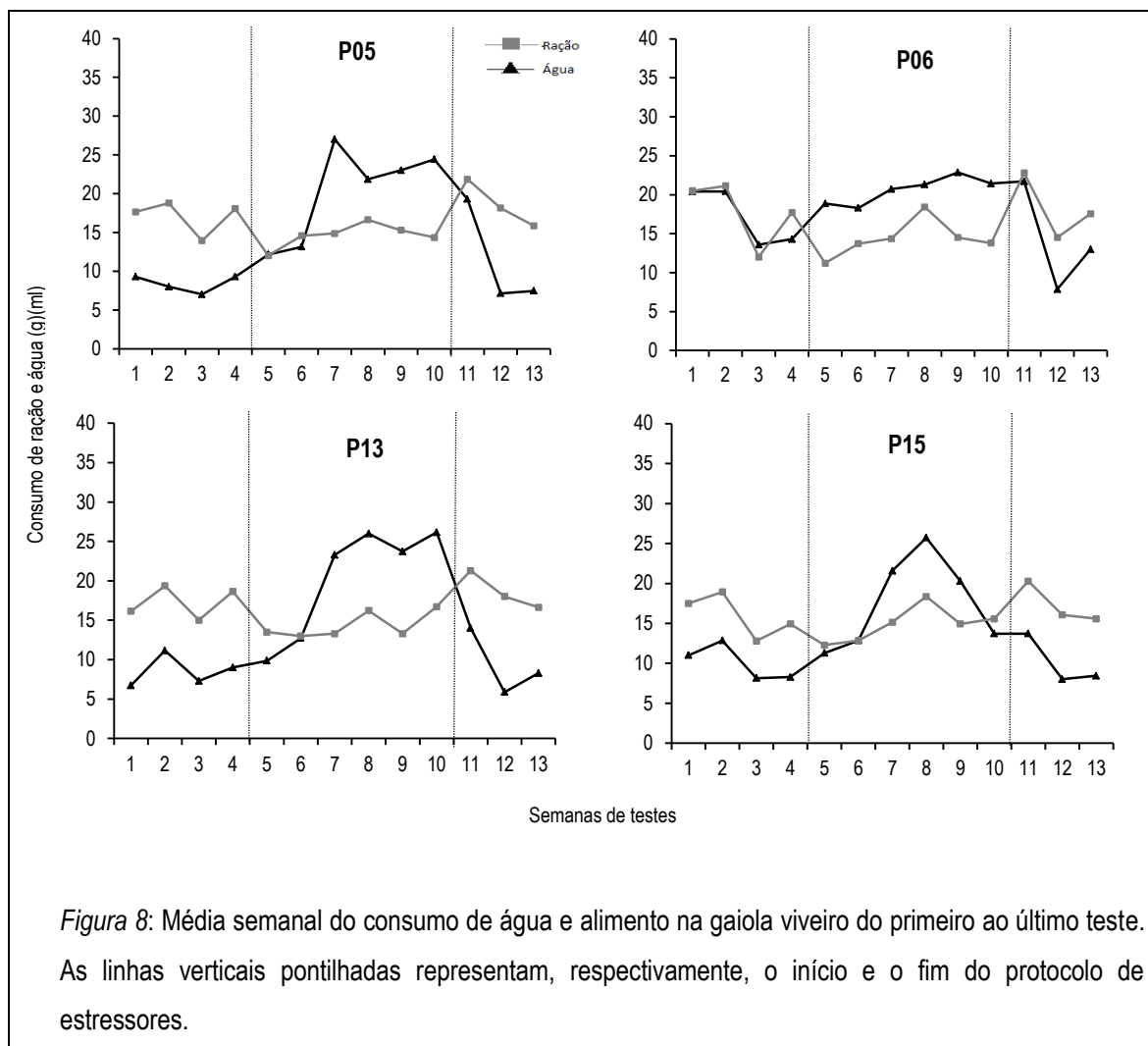


Observa-se na Figura 6 que a linha referente à média do consumo de ração acompanha sistematicamente a linha referente ao consumo de água do sujeito C10. Na maior parte das semanas o consumo de alimento é de cerca 15g e 10 ml de água. Esse dado difere na segunda e na terceira semanas, em que há respectivamente um aumento e uma queda nesse valor e também na semana 10, em que há uma pequena diminuição.



Quanto aos sujeitos do Grupo M, observa-se nesse grupo que o consumo semanal de ração manteve-se com variação entre 15 e 20g para a maioria dos sujeitos. Com exceção do sujeito M23 que na segunda semana teve um pico na média de consumo.

Em relação à média de água ingerida na semana, há uma variação maior em relação ao consumo médio de ração (no caso do sujeito M21 a diferença entre o ponto máximo e mínimo consumido chegou à aproximadamente 20ml) e as curvas referentes à ingestão de água e ração não possuem uma correspondência sistemática como visto na de C10 (Figura 6). Provavelmente o aumento da ingestão de água tem relação com a diminuição de peso, pois quando o peso diminuía a valores próximos de 80% do peso *ad lib*, era disponibilizada mais água para os sujeitos.



Na Figura 8, que se refere à média semanal do consumo de água e ração do Grupo P, percebe-se que há uma semelhança entre os sujeitos no que diz respeito ao consumo de ração: antes do protocolo de estressores há uma queda seguida de aumento a cada semana, com variação de 12 a 20g (P6 e P15) ou valores próximos de 15 a 19g (P5 a P13). Durante a submissão ao protocolo de estressores, há uma variação menos acentuada no consumo, exceto na Semana 8 em que há um maior aumento no consumo de ração para todos os sujeitos. Além disso, aparentemente há um decréscimo da ingestão de ração no início do protocolo, e ligeiro aumento no decorrer da submissão aos estressores; após o protocolo, o consumo aumenta e, a partir da segunda semana, volta a decrescer.

Em relação ao consumo de água, nota-se que não houve correspondência com o consumo de ração para nenhum sujeito. Além disso, de maneira geral, pode-se dizer que houve um aumento de ingestão de água durante o protocolo para todos do grupo. É importante salientar que no período em que os sujeitos foram submetidos ao protocolo, houve um aumento na quantidade diária de água colocada pelo experimentador para os sujeitos, a fim de que o peso dos sujeitos se mantivesse entre os valores de 80 a 85% do peso *ad lib* (esses valores chegaram abaixo de 80%, como já foi demonstrado na Figura 4).

A Figura 9 mostra o consumo semanal de água e ração do Grupo MP (manipulação neonatal e protocolo):

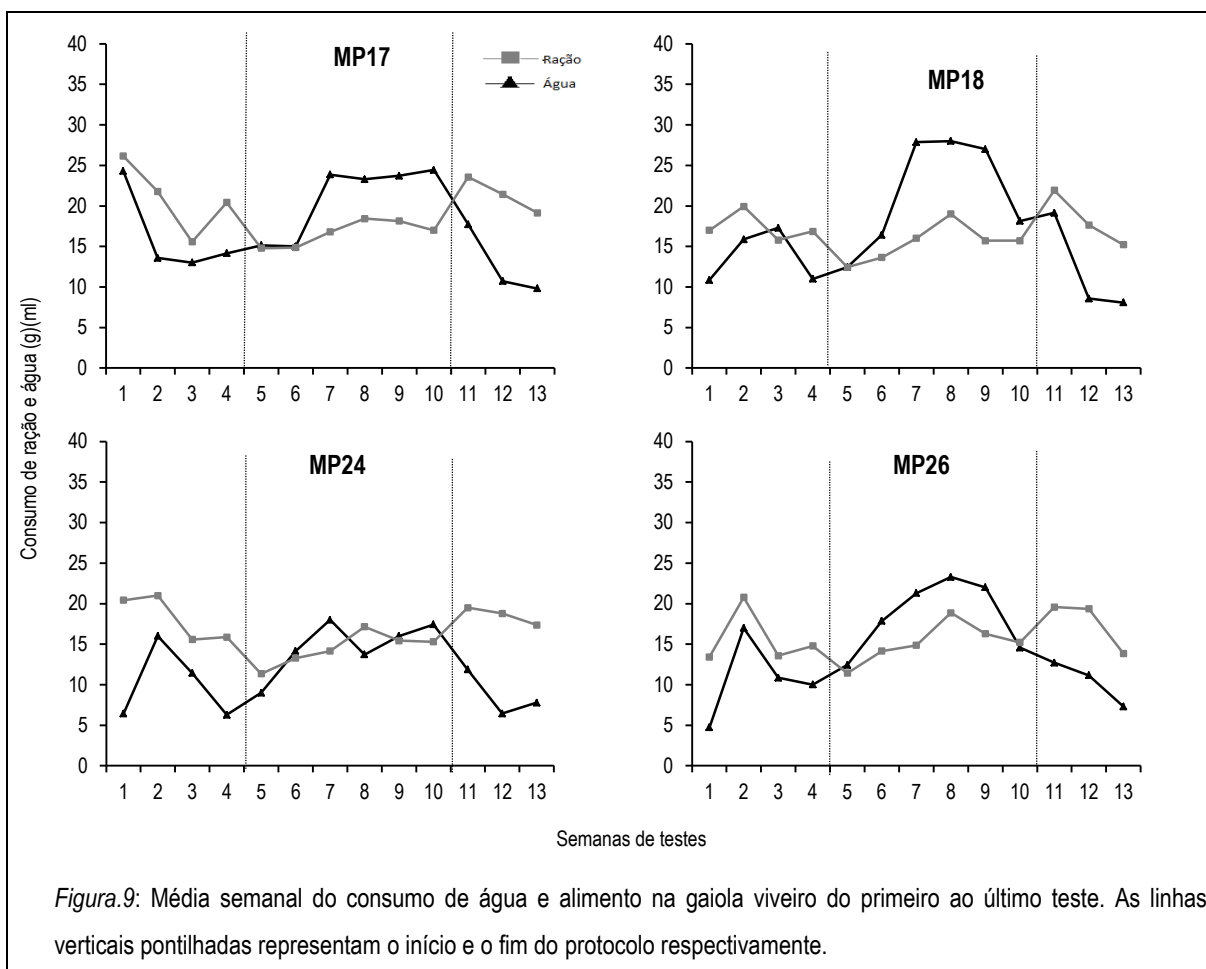


Figura.9: Média semanal do consumo de água e alimento na gaiola viveiro do primeiro ao último teste. As linhas verticais pontilhadas representam o início e o fim do protocolo respectivamente.

Em relação ao consumo médio semanal de ração, o Grupo MP apresenta dados semelhantes para todos os sujeitos: tendência decrescente antes do protocolo de estressores; durante o protocolo de estressores, há pequeno declínio nas primeiras semanas, seguido de aumento no decorrer das semanas desse período; após o fim dos

estressores, o consumo aumenta nas primeiras semanas e torna a declinar nas semanas finais.

Quanto ao consumo de água, nota-se que há um acentuado aumento. Isso é diferente para o sujeito MP24 em que há uma queda no consumo de água da semana 8. Provavelmente durante esse período, o peso do sujeito MP ultrapassou os 85% do peso *ad lib*, e precisou ser disponibilizado menos água a fim de mantê-lo no peso necessário.

O aumento do consumo de água durante o protocolo é um dado semelhante ao da Figura 8 referente ao consumo semanal do Grupo P, provavelmente pelas mesmas razões: o peso corporal ter chegado a valores próximos e até menores que os 80% do peso *ad lib* e ter sido disponibilizado mais água diariamente a fim de que os sujeitos recuperassem o peso para os valores do intervalo entre 80 e 85% do peso *ad lib*.

Nota-se que a linha do consumo de ração e de água aparecem com maior correspondência nos períodos em que os sujeitos não estão sendo submetidos ao regime de estressores.

Pode-se perceber que a diferença principal no que se refere ao consumo semanal de água e de ração está entre o grupo que não passou pelo protocolo (M) mais o sujeito controle C10 e os grupos que passaram pelos protocolos (P e MP). Assim, o grupo que não passou pelo regime de estressores apresentou maior correspondência entre o consumo de ração e o de água e manteve um consumo sem grandes alterações (com algumas exceções) durante a maior parte das semanas. Já os sujeitos que passaram pelo protocolo, tiveram a tendência da média de consumo de ração diferente da de água, principalmente durante o protocolo de estressores em que houve um aumento significativo da ingestão média de água, com o consumo de ração sofrendo pouca alteração nesse período.

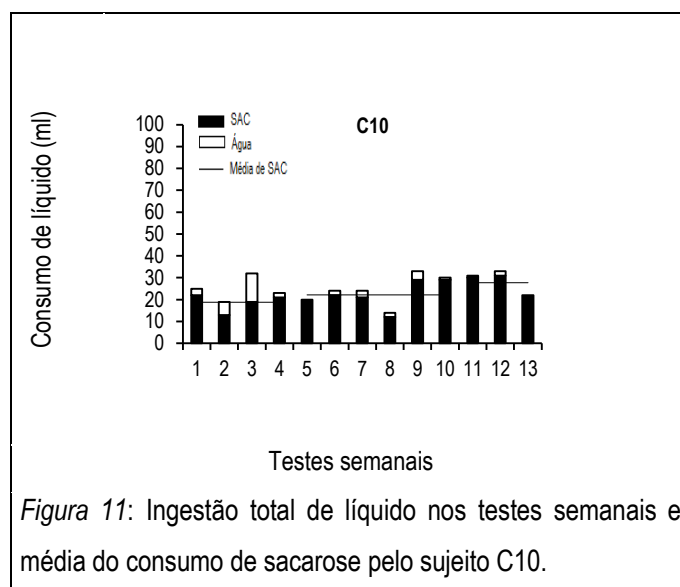
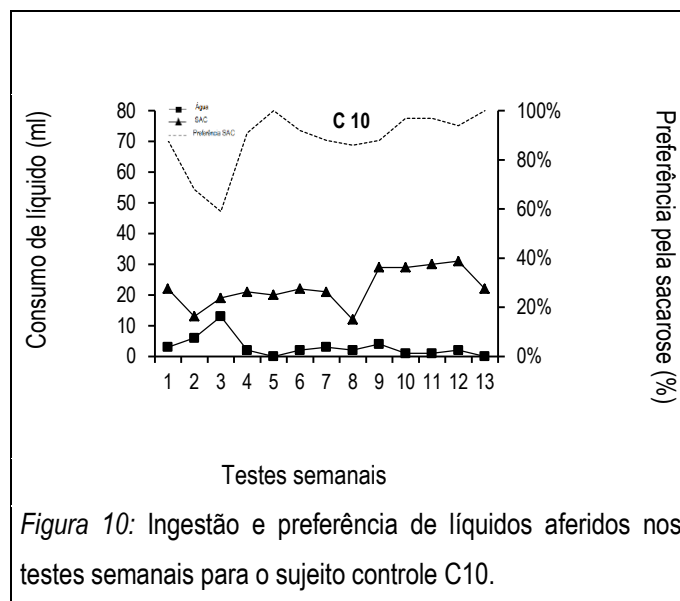
Esses resultados indicam que, em relação ao consumo de ração, o protocolo de estressores foi responsável por uma pequena diminuição no consumo de ração durante a submissão aos estressores. Isso se deve ao regime de privação de ração ao qual os ratos foram submetidos durante o protocolo. Os estudos de Rodrigues (2005), Oliveira (2009) e Thomaz (2009) apresentaram manutenção na média de consumo de ração e Cardoso (2008) afirma que os sujeitos apresentaram aumento nesse consumo. Thomaz (2001) e Dolabela (2004) não aferiram o consumo e no estudo de Pereira (2009) o consumo

relativo à média semanal também foi maior durante o protocolo. Porém, no presente estudo, os dados são controversos, visto que a média semanal do consumo de ração diminuiu para todos os sujeitos que passaram pelo protocolo. Essa diminuição do consumo de ração, pode estar relacionada à oscilação e diminuição do peso para esses sujeitos durante o período de submissão ao protocolo.

Em relação à água, o efeito foi contrário, havendo aumento da média de ingestão de água durante o protocolo para os sujeitos que foram submetidos a esta condição. Dados diferentes da maioria dos outros estudos realizados no Laboratório de Psicologia Experimental como os de Rodrigues (2005), Oliveira (2009) e Thomaz (2009). Apesar disso, como já foi dito anteriormente, o peso dos sujeitos diminuiu durante o regime de estressores, sendo possível afirmar que a privação de ração e a submissão a estímulos aversivos proporcionam a diminuição do peso, apesar de aumento significativo da ingestão de água.

Teste de ingestão e preferência de líquido

Nas Figuras 10 e 11 estão os resultados dos testes de ingestão e preferência de líquidos aferidos semanalmente. A Figura 10 mostra os dados do sujeito controle (C10), referentes à ingestão de água e de sacarose, bem como a porcentagem de preferência do consumo de sacarose em relação ao de água.



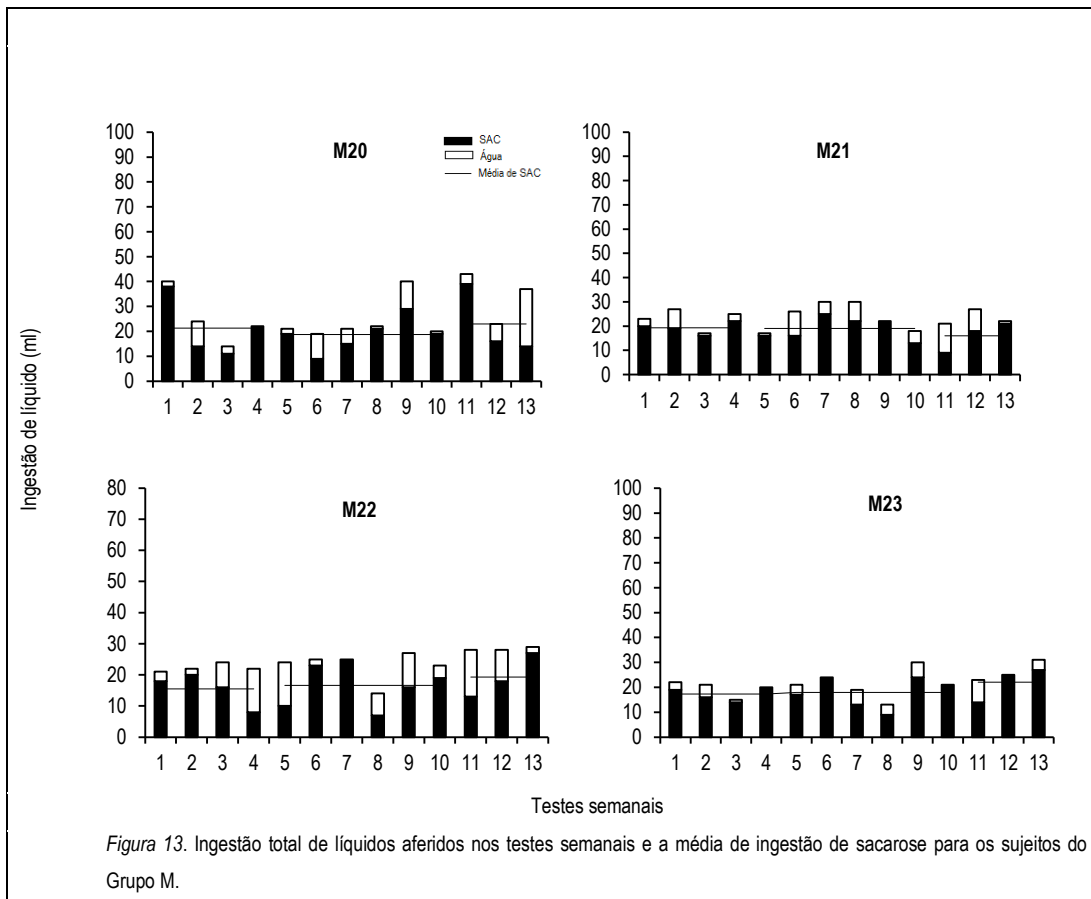
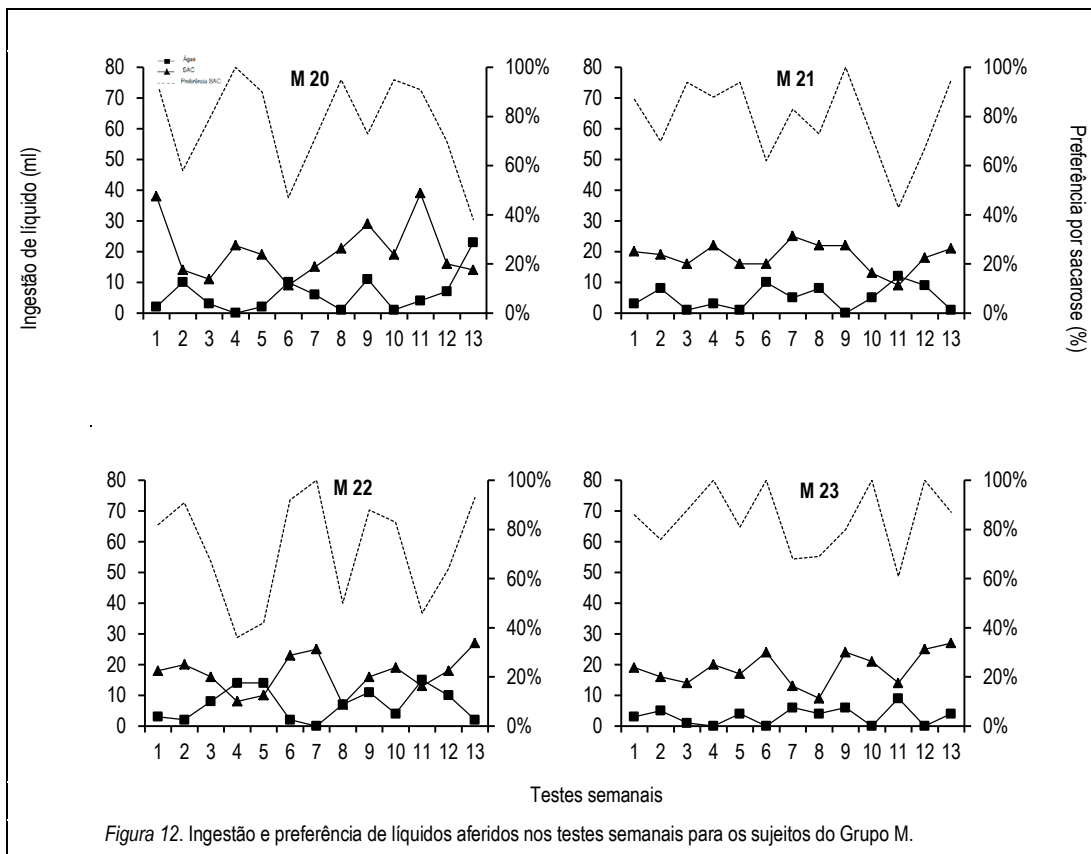
Conforme apresentado na Figura 10, a ingestão de água com sacarose é maior que a ingestão de água em todos os testes, com valores que variam entre 10 e 30 ml. Em relação à preferência pela solução de sacarose, nota-se que, para o sujeito C10, há uma queda acentuada no segundo e terceiro testes, chegando a 60%. A partir do 4º teste a preferência aumenta e se mantém acima de 80% até o final.

A Figura 11 mostra mais claramente que o consumo de sacarose do sujeito C10 foi superior ao consumo de água pura durante todos os testes. Vale lembrar que esse sujeito não passou por manipulação neonatal, nem pelo protocolo de estressores, mas foi mantido em restrição de água a 85% do peso *ad lib*. Em relação à média de solução de sacarose ingerida, nota-se que ela foi aumentando no decorrer do experimento. A média foi calculada separadamente entre quatro primeiros testes, os seis seguintes e três últimos, a fim de comparar com os sujeitos que foram submetidos ao protocolo (quatro testes antes, seis durante e três após a submissão aos estressores).

O consumo total corresponde à soma dos dois líquidos, apresenta valores aproximados na maior parte dos testes, com valores entre 20 e 30 ml. Somente no Teste 8 houve um consumo mais baixo (12 ml). Acompanhando a curva de preferência, o consumo total apresenta valores maiores nos últimos testes, porém no Teste 3, em que a preferência por sacarose foi baixa, o consumo total atingiu o valor máximo, visto que houve alta ingestão de água nesse dia. Esse dado chama atenção, pois a oscilação de preferência mais acentuada nos testes iniciais, quando as garrafas eram apresentadas uma de cada vez em lados alterados a cada teste, que o sujeito ainda estava sob controle da posição. Isso será discutido posteriormente para os sujeitos dos próximos grupos.

Os dados desse sujeito estão de acordo com os sujeitos controle de Willner *et al* (1987) que não passaram pelos estressores e apresentaram aumento no consumo de sacarose a partir da terceira semana de teste.

As Figuras 12 e 13 mostram os dados de ingestão preferência de líquido referente ao Grupo M.



Para os sujeitos que passaram apenas pela manipulação neonatal, é difícil falar de um padrão semelhante entre todos os sujeitos: nota-se maior semelhança entre os M21 e M23 e entre o M20 e M22.

No que se refere à ingestão de água com sacarose, por exemplo, nota-se que apenas para o sujeito M23, consumo dessa substância é maior que o de água pura em todos os testes. Dado que também pode ser visto na curva de preferência, cujos valores de preferência pela sacarose são, na maioria dos testes, próximos a 80%. Com exceção do Teste 11 em que a preferência por sacarose, cai para 60%. O M22, apresenta dados de ingestão de sacarose semelhantes ao do M21, porém com uma queda mais acentuada da ingestão de preferência, nos permitindo dizer que não houve preferência por esse líquido visto que o valor foi de 40%. Ou seja, nesse teste o sujeito M21 preferiu água à sacarose.

Os sujeitos M20 e M22, apresentaram valores de ingestão de sacarose em relação à água que oscilaram durante todo o período de testes. Para o sujeito M20, em três dos 13 testes (Teste 2, 6 e 13), o consumo de solução de sacarose foi praticamente igual ou inferior ao consumo de água pura. Isso também aconteceu para o sujeito M22 nos testes 4, 5, 8 e 11. Dados que podem ser vistos também na curva de preferência por sacarose, aonde nesses testes chega a valores abaixo de 50%, representando uma não preferência pela substância adocicada.

Esses dados se contrapõem a uma parte da literatura sobre manipulação neonatal (ou separação materna) tais como Michaels e Holtzman (2006) e Michael e Holtzman (2007) em que os resultados dos testes de preferência mostram maior consumo de substâncias palatáveis em contraposição ao consumo de água pura.

Analisando os valores da média de ingestão de solução de sacarose, mostrada na Figura 13, nota-se que houve um pequeno aumento nas três últimas semanas para três dos sujeitos M20, M22 e M23. Dado que se assemelha ao do sujeito C10. No entanto, para o sujeito M21, houve um pequeno decréscimo da média relativo às últimas três semanas dos testes.

Levando-se em consideração o consumo total, percebe-se que os sujeitos M21 (entre 20 e 30 ml), M22 (entre 20 e 30 ml) e M23 (também entre 20 e 30 ml) apresentam pouca oscilação entre os testes durante todo o experimento. O sujeito M20 é

o que apresenta maior diferença de consumo total entre os testes, com mínimo de aproximadamente 10 ml (na semana 3) e máximo 40 ml aproximadamente (na semana 11). Além disso, em alguns testes (Teste 13 do sujeito M20, Teste 11 do sujeito 21 e os Testes 5, 6 e 11 do sujeito M22) o consumo total de líquido aumentou, apesar de constar diminuição na preferência por sacarose.

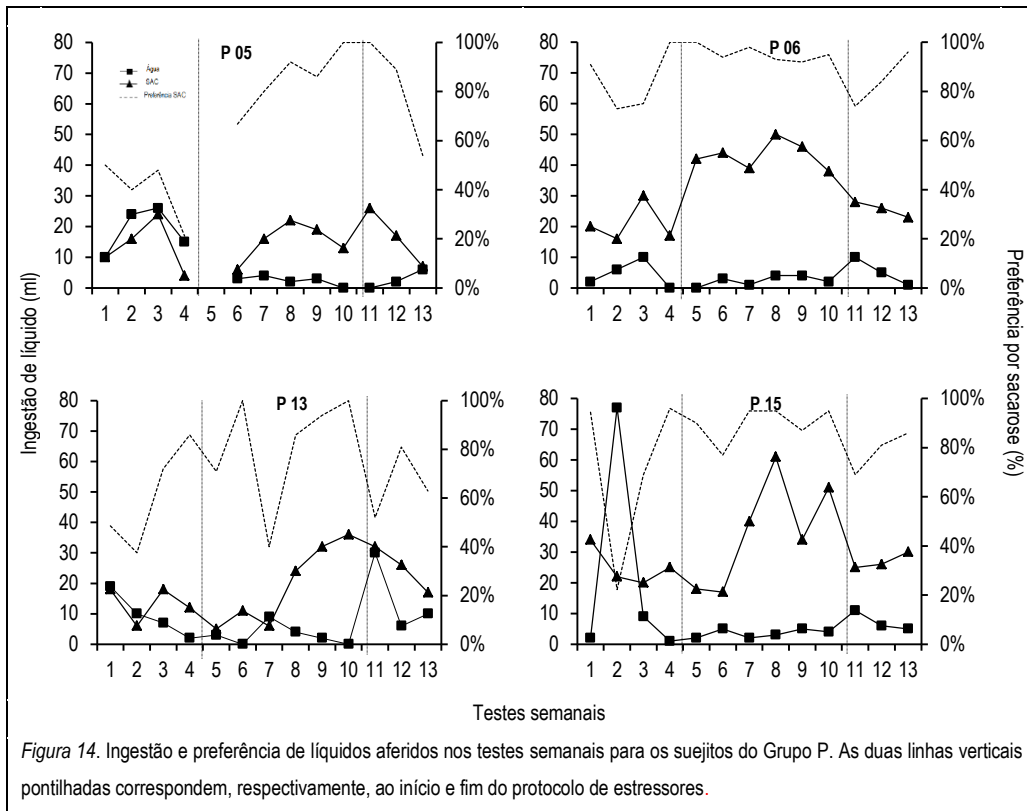


Figura 14. Ingestão e preferência de líquidos aferidos nos testes semanais para os sujeitos do Grupo P. As duas linhas verticais pontilhadas correspondem, respectivamente, ao início e fim do protocolo de estressores.

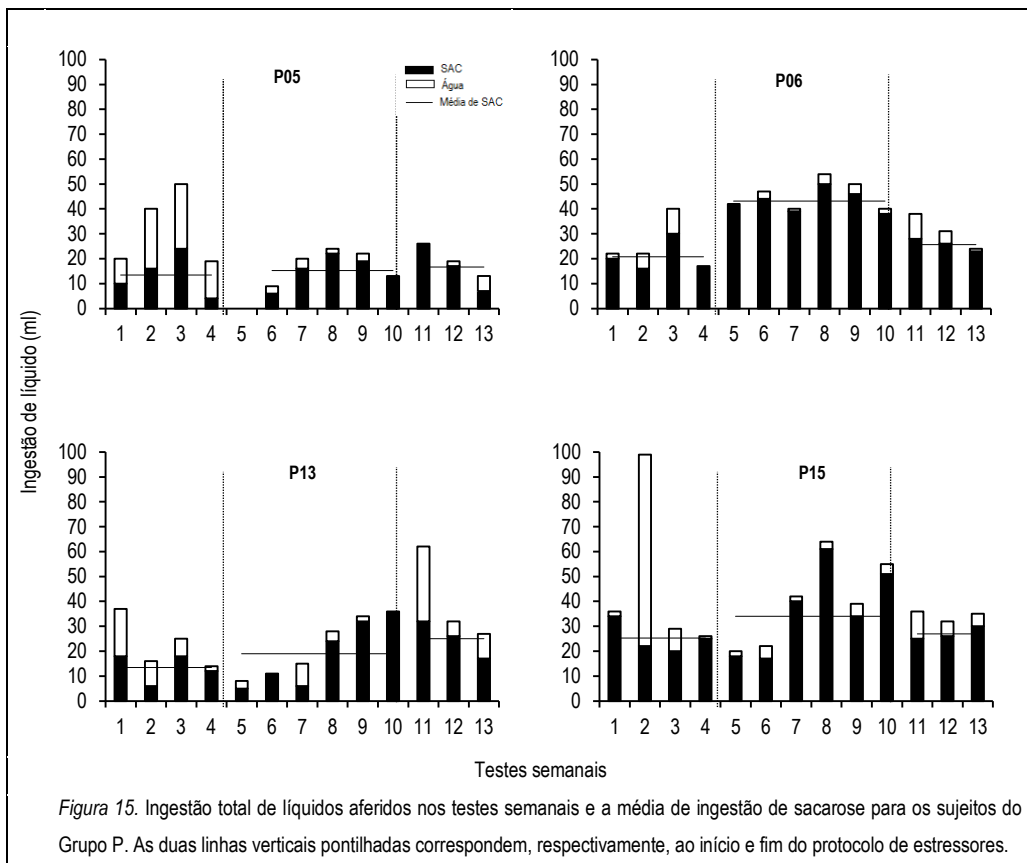


Figura 15. Ingestão total de líquidos aferidos nos testes semanais e a média de ingestão de sacarose para os sujeitos do Grupo P. As duas linhas verticais pontilhadas correspondem, respectivamente, ao início e fim do protocolo de estressores.

Os resultados dos testes de consumo e preferência de líquido apresentados na Figura 15 são relativos ao Grupo P, que passou apenas pelo protocolo de estressores. A ingestão de solução de sacarose em relação à ingestão de água para esse grupo foi maior durante todos os testes para dois sujeitos o P06 e o P15¹. Já para os sujeitos P05 e P13, isso não acontece: o P05² apresenta maior consumo de água em relação à sacarose nos testes antes do protocolo e o P13, em quatro testes (dois antes do protocolo, um durante e um depois).

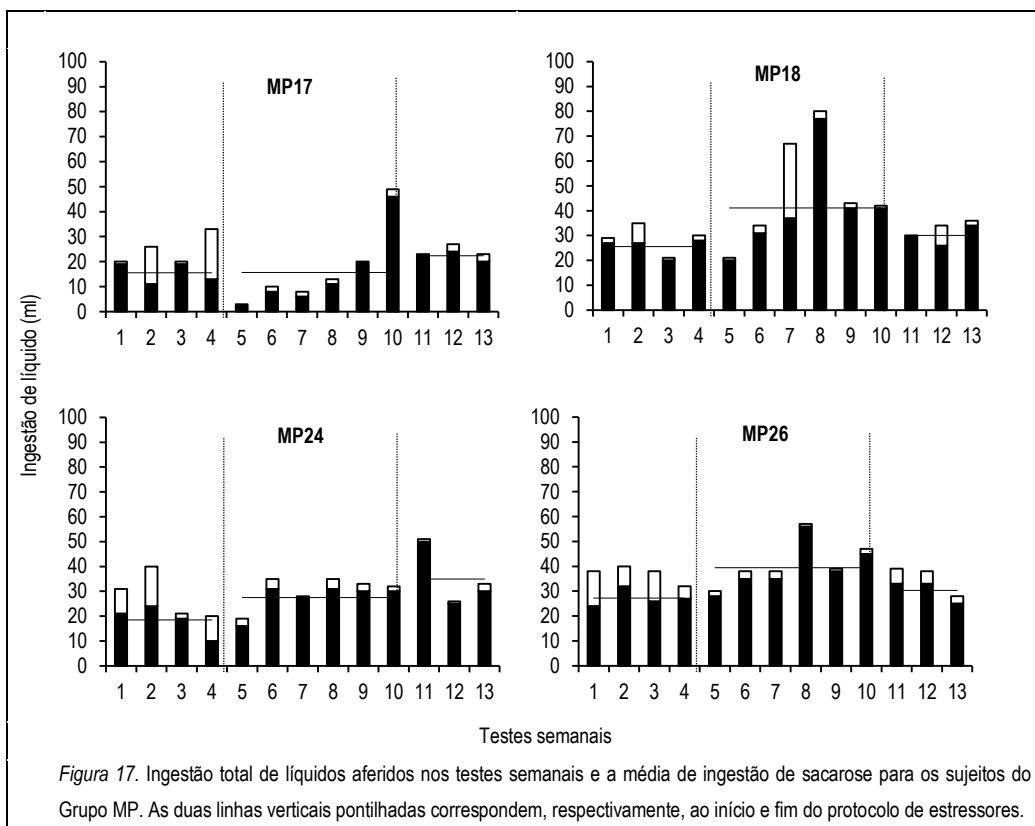
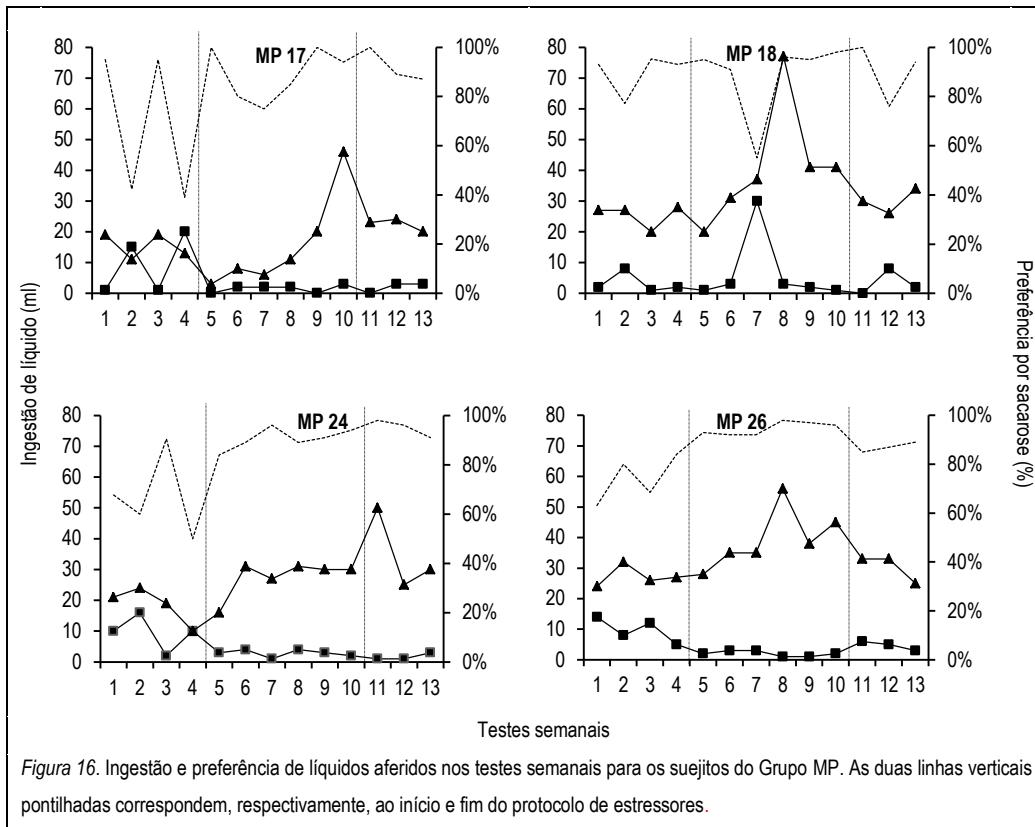
Sendo assim, a curva de preferência de sacarose em relação à de água, para os sujeitos P06 e P15, fica entre valores de 80 a 100% aproximadamente, enquanto as dos sujeitos P05 e P13 oscilam entre valores abaixo de 60% a 100% durante o período dos testes.

Os dados apresentados na Figura 15 chamam atenção aos valores das médias de ingestão de sacarose. Para todos os sujeitos, a média de consumo durante o protocolo de estressores são maiores do que a média do período que antecede ao protocolo. Enquanto o P05 e o P13 continuam aumentando a média de consumo após o fim dos estressores, a média dos P06 e P15 volta a diminuir. Ou seja, Para o P05 e o P13, houve maior consumo médio de sacarose no período que corresponde ao período após o fim do protocolo e, para os sujeitos P06 e P15, a média atinge valores maiores durante os estressores.

Esses dados diferem dos primeiros estudos realizados no Laboratório de Psicologia Experimental como os de Thomaz (2001), Dolabela (2004) e Rodrigues (2005), porém estão de acordo com os dados de Cardoso (2008) e Pereira (2009) em que também houve aumento de solução adocicada durante o período de submissão ao protocolo de estressores.

¹ No teste 2 do sujeito P15, o consumo de água chegou a 77 ml, o que corresponde a um valor discrepante para o consumo de líquido em 1h. Provavelmente houve um problema que não foi identificado na garrafa de testes.

² Os dados do teste 5 do sujeito P05 teve que ser descartado, pois houve vazamento de líquido da garrafa usada no teste.



Como pode ser visto na Figura 16, os dados de ingestão de sacarose comparados aos de ingestão de água, são sempre maiores, para os sujeitos MP18 e MP24 (exceto no Teste 4 em que houve consumo igual ao da água pura) e o MP26. O sujeito MP17 apresenta alternância entre maior e menor ingestão de sacarose em relação à água. Isso pode ser visualizado pela curva de preferência onde nota-se uma oscilação para todos os sujeitos nos testes anteriores à apresentação de estressores. No entanto, para o sujeito MP17 essa oscilação se dá de forma mais acentuada (entre 100 a 40% a cada teste). Isso dá indícios de que os sujeitos, nos primeiros testes, ficaram sob controle da posição da garrafa e a diminuição da oscilação tenha ocorrido a partir do Teste 5, pois foi o momento em que os testes passaram a ser feitos com as garrafas sendo colocadas simultaneamente. Esse período também corresponde ao início do protocolo de estressores.

De qualquer forma, para todos os sujeitos do Grupo MP, percebe-se que a preferência se estabiliza em valores acima de 80% a partir desse período (teste 5), embora haja uma exceção referente a um único teste (Teste 7) do sujeito MP18.

Semelhante à média de consumo de solução de sacarose está o consumo total de líquidos, onde há aumento durante o protocolo de estressores. O sujeito MP17 parece ter reduzido a ingestão total de líquido durante esse período, embora o valor máximo ingerido dos dois líquidos tenha sido no último teste da submissão aos estressores.

Comparando esses resultados aos do Grupo P, nota-se grandes semelhanças entre eles. Os dois grupos apresentaram aumento da preferência e da ingestão de sacarose durante o protocolo, apenas em testes isolados apresentaram diminuição de preferência durante esse período; o consumo total de líquido também foi semelhante, com a maior parte dos sujeitos tendo aumento dessa medida durante o protocolo de estressores.

Além disso, pode-se dizer que a comparação entre os grupos referentes aos testes de ingestão e preferência acerca do efeito da variável manipulação neonatal no CMS ficou debilitada, visto que nem Grupo P sofreu anedonia. Como o Grupo P que passou apenas pelo protocolo de estressores já apresentou um efeito parecido com uma “imunização” ao CMS, não se pode dizer que o aumento da preferência e ingestão do durante os estressores do Grupo MP é resultado da manipulação neonatal.

Como já foi dito, outros estudos realizados no Laboratório de Psicologia Experimental também encontraram resultados semelhantes a esse, como os de Cardoso (2008), alguns sujeitos de Oliveira (2009), Pereira (2009) e alguns dos sujeitos de Thomaz (2009). Cada um desses autores justificaram a não diminuição no consumo e preferência de solução de sacarose a 2% a partir do efeito de diferentes variáveis. Cardoso (2008) atribui ao esquema de VI utilizado nas sessões operantes, enquanto Oliveira (2009) relata que o acesso à roda de atividades foi um dos principais responsáveis por isso. Já Thomaz (2009) expande a análise dos efeitos das sessões operantes com resposta que produzem outro tipo de reforçador diferente de solução de sacarose, como o alimento e, é a exposição a essa condição que justifica esse efeito. Essa interpretação não é possível para o presente estudo, visto que os sujeitos não foram submetidos às sessões operantes Pereira (2009) sugere que a não produção de anedonia tem relação com procedimento de manipulação neonatal realizado durante a pesagem desde os primeiros dias de vida. Hipótese que foi o objeto de estudo do atual experimento.

Sobre esses resultados que vão na direção oposta aos comumente encontrados nos experimentos sobre CMS, Willner (2005) chama-os de resultados “anômalos”. Esse autor afirma que a quantidade de estudos que apresentam esses resultados representam uma parte muito pequena da literatura se comparada aos trabalhos que apresentam os resultados de produção de anedonia. Apesar disso, Willner (2005) mostra que algumas diferenças individuais podem estar relacionadas à suscetibilidade a mudanças induzidas pelo CMS, como gênero, idade, condições de criação, hora do dia em que o teste foi realizado, isolamento individuais, padrões de expressão genética e até o tipo de linhagem. Nenhuma dessas variáveis justifica sozinhas os resultados encontrados nesse trabalho visto que pelo menos uma dessas condições foram semelhantes às utilizadas em pelo menos um trabalho realizado no Laboratório de Psicologia Experimental da PUCSP que apresentou diminuição no consumo de preferência durante o protocolo de estressores.

No entanto, vale ressaltar que todos os outros trabalhos realizados no Laboratório de Psicologia Experimental da PUCSP foram realizados em outro laboratório e podem ter diferenças nas condições de criação. Ainda assim, essa não parece ser a variável responsável pela diferença de resultados encontrados em relação

aos estudos de Willner, visto que mesmo no Laboratório antigo já tinha apresentado estudos com resultados controversos (como Cardoso, 2008 e Pereira, 2009).

Um aspecto importante já apontado por Oliveira (2009) diz respeito à medida do teste ser ingestão e preferência ser considerada adequada ou suficiente para mostrar anedonia. Segundo esse autor, os testes semanais foram capazes de medir os efeitos do CMS apenas para o sujeito que passou somente pela condição de submissão ao protocolo de estressores, pois foi possível perceber uma redução da preferência de ingestão nesse período. Para os outros sujeitos que passaram pela condição operante, por exemplo, os testes mostraram resultados contrários à anedonia, porém para outras medidas, como compartimentos da caixa, diminuição das respostas de pressão à barra e redução da ingestão de água durante as sessões puderam mostrar o efeito do CMS.

Diferente de todos os outros estudos, o presente trabalho foi o único do Laboratório que utilizou unicamente os testes de consumo e preferência de líquidos semanais, visto que nenhum dos sujeitos foi submetido às condições operantes que davam acesso a reforçadores como água, água com sacarose, alimento ou acesso à roda de atividade. Isso pode ter limitado a avaliação dos efeitos do protocolo, pois não foi possível comparar os resultados dos testes com outras medidas, como a frequência de pressão à barra: pode ser que utilizando outras medidas, fosse possível perceber outros efeitos da submissão ao protocolo de estressores, como foi encontrado por Oliveira (2009). Alguns autores como Weiss (1997) e Reid, Forbes, Stewart, Matthews (1997) entre outros artigos publicados criticam a utilização desses testes como medida de anedonia, afirmando que outras variáveis, como por exemplo, apenas a privação de comida pode alterar a ingestão de água com sacarose.

Pode-se dizer portanto que, com as medidas utilizadas no presente estudo, teste de consumo e preferência de líquidos, o CMS produziu efeitos contrários ao da anedonia, pois houve aumento da ingestão de sacarose tanto para os sujeitos que passaram apenas pelo protocolo (Grupo P), quanto para os que também passaram pela manipulação neonatal (Grupo MP).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Existe na literatura sobre *Chronic Mild Stress* (CMS) um conjunto de vasto de experimentos que apresentam redução no consumo e preferência por solução de sacarose e uma pequena parte com estudos que não obtiveram esse resultado, denominado de anedonia (Willner, 1997; Willner, 2005). No Laboratório do Programa de Pós Graduação em Psicologia Experimental: Análise do Comportamento uma linha de pesquisa sobre o CMS e a relação com o comportamento operante tem sido desenvolvida desde 2001 (Thomaz, 2001; Dolabela, 2004; Rodrigues, 2005; Cardoso, 2008; Pereira, 2009, Oliveira, 2009, Thomaz, 2009). Alguns desses estudos também produziram resultados que estão de acordo com os resultados de Willner, porém outros estudos não, como o de Pereira, 2009.

Pereira (2009) observou que a ingestão de sacarose durante os testes aumentou para os sujeitos, independente das condições experimentais de sessão operante e/ou privação aos quais foram submetidos. Uma das hipóteses levantadas por Pereira (2009) foi a de que o procedimento de pesagem desde os primeiros dias de vida, considerada manipulação neonatal pode ter sido responsável por esse resultado. Existe uma vasta literatura sobre procedimentos de separação neonatal que embasam essas hipótese.

O presente estudo, visando identificar possíveis variáveis capazes de interferir nos efeitos do *Chronic Mild Stress* a ponto de ser apresentado efeitos contrários, buscou investigar a possível interação entre a manipulação neonatal e a submissão ao protocolo de estressores.

Três grupos de quatro sujeitos passaram por condições diferentes de 1) apenas manipulação neonatal 2) apenas protocolo e 3) manipulação neonatal mais protocolo, e um sujeito que não passou por nenhuma dessas condições, apenas pelos testes de líquidos.

Três medidas foram utilizadas: peso, consumo de ração e de água na gaiola viveiro e testes semanais de ingestão e preferência de líquido.

Em relação ao peso, todos os sujeitos que passaram pelo protocolo de estressores, o Grupo P e o Grupo MP, obtiveram queda nos valores de peso com maior oscilação, chegando a valores abaixo de 80% do peso *ad lib* para a maioria dos sujeitos.

Dados que corroboram aos estudos anteriores do Laboratório de Psicologia Experimental da PUCSP, de Willner e da maioria dos estudos sobre CMS.

Em relação ao consumo de alimento e água na gaiola viveiro, notou-se que todos os sujeitos que passaram pelo protocolo de estressores, também independente de terem sido submetidos à manipulação neonatal, apresentaram aumento na ingestão de água durante o protocolo e também diminuição do consumo de ração desse período. Os valores de consumo para essas duas substâncias foram calculados em médias semanais. Resultado que se contrapõe aos estudos anteriores do Laboratório de Psicologia Experimental, em que não houve alteração nos valores do consumo de ração e água nesse período. Os resultados do presente trabalho indicam a possibilidade de que o estressor privação de ração, e consequente diminuição da média de consumo semanal durante o protocolo, foi o principal responsável pela diminuição do peso. Vale ressaltar que restrição de água se manteve presente a 85% do peso *ad lib* a partir dos três meses de vida até o fim do experimento e durante o protocolo, a fim de manter os sujeitos entre os 80 e 85% foi disponibilizado mais água.

Para os testes semanais, observou-se que o sujeito C10 apresentou preferência acima de 80% a partir do terceiro teste, resultado esperado de acordo com os experimentos anteriores e com Willner *et al* (1987). Para o Grupo M, de modo geral, houve aumento consumo total de líquido, semelhante ao C10, mas não é possível dizer que foi estabelecida a preferência pela solução de sacarose pois oscilação se manteve acentuada durante todos os testes.

Os grupos que passaram pelo protocolo, independente de terem sido submetidos à condição de manipulação neonatal apresentaram dados semelhantes. Tanto o Grupo P quanto o MP, de maneira geral apresentaram oscilação de preferência no período sem estressores e apresentaram aumento da ingestão e preferência por sacarose durante as semanas de submissão ao protocolo.

Esses dados não corroboram com os dados de Willner *et al* (1987), Thomaz (2001), Dolabela (2004), Rodrigues (2005) no que se refere aos efeitos do CMS. E também não sustentam a hipótese de que a manipulação neonatal com separação materna de 15min tenha aumentado a ingestão de preferência por sacarose. Experimentos futuros poderiam testar se intervalos de tempo diferentes de separação da

mãe têm efeitos diferentes sobre a ingestão de solução sacarose a sujeitos submetidos ao protocolo de estressores.

Além disso, trabalhos futuros poderiam tentar isolar ou minimizar a influência das variáveis consideradas por Willner (2005) como possíveis responsáveis pelos resultados “anômalos”, replicando o mais próximo possível aos estudos em que produziram anedonia. Entre elas estão: condições de criação com menos perturbação possível (a fim de diminuir a exposição a estressores que não os do protocolo); isolamento individual mais cedo (de acordo com Clarissa (2009) aos 30 dias), usar ratos de linhagem diferente de *Wistar*, como a *Mc Cowley* usada por Dolabela (2004) e Rodrigues (2005) e mudar o horário dos testes semanais de consumo, por exemplo.

Além disso, uma medida adicional aos testes de consumo e preferência de líquido, como a medida do desempenho das sessões utilizadas nos outros estudos podem ajudar a ter uma análise mais aprimorada dos efeitos do CMS.

REFERÊNCIAS

- Cardoso, L. R. D. (2008). Efeitos do esquema de intervalo variável na preferência e no consumo de líquidos apresentados por ratos submetidos ao chronic mild stress. (Dissertação de mestrado). Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo, SP.
- Costela, C., Tejedor-Real, P., Mico, J.A & Gibert-Rahola, J. (1995). Effects of Neonatal Handling on Learned Helplessness Model of Depression. *Physiology & Behavior*, 57,407-410.
- Dolabela, A.C.F.O. (2004). *Um estudo sobre as possíveis interações entre o Chronic Mild Stress e o desempenho operante*. Dissertação de Mestrado, Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo.
- Forbes, Stewart, Matthews e Reid (1996).
- Kremer, R; Martins, O; Teixeira, G.R.; Pinheiro, P.F.; Mello Junior, W; Martinez, F.E. (2008). Estresse na infância de roedores. *PUBVET*, 2.
- Michael, C.C. & Holtzman, S.G. (2006). Neonatal stress and litter composition alter sucrose intake in both rat dam and offspring. *Physiology & Behavior*, 89, 735-741.
- Michael, C.C. & Holtzman, S.G. (2007). Enhanced Sensitivity to Naltrexone-induced Drinking Suppression of Fluid Intake and Sucrose Consumption in Maternally Separated Rats. *Pharmacology Biochem Behav*, 86(4):784-796.
- Pereira, CM. (2009). *Chronic Mild Stress: um estudo sob a interação entre submissão ao protocolo de estressores, comportamento operante e privação*. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo.
- Reid, Forbes, Stewart, Matthews (1997). Chronic mild stress and depressive disorder: a useful new model? *Psychopharmacology*, 134, pp. 365-367.
- Rodrigues, M,B. (2005). *Interações entre o Chronic Mild Stress e o Desempenho Operante: uma Replicação de Dolabela (2004)*. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo.

Silveira, P.P, Portella, A.K., Clemente, Z., Bassani, E., Tabajara, A.S., Gamaro, G.D., Dantas, G., Torres, I.L.S., Lucion, A.B., Dalmaz, C.(2004). *Physiology & Behavior*, 80, 739-745.

Thomaz, C.R.C. (2001). *O Efeito da Submissão ao Chronic Mild Stress (CMS) sobre o Valor Reforçador do Estímulo*. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica de São Paulo, São Paulo.

Thomaz, C.R.C. (2009). *Possíveis inter-relações entre a submissão ao Chronic Mild Stress (CMS) e o desempenho operante*. Tese de Doutorado. Instituto de Psicologia da Universidade de São Paulo, São Paulo.

Oliveira, A.C.F. (2009). *Estresse Moderado Crônico: efeitos sobre a atividade geral em ratos*. Tese de Doutorado. Universidade de Brasília, Brasília.

Weiss (1997). Does decreased sucrose intake indicate loss of preference in CMS model? *Psychopharmacology*, 134, pp. 368-370.

Willner, P., Towell, A., Sampson, D., Sophokleous, S. & Muscat, R. (1987). Reduction of sucrose preference by chronic unpredictable mild stress, and its restoration by a tricyclic antidepressant. *Psychopharmacology*, 93, 358-364.

Willner, P. (1997a). Validity, reliability and utility of the chronic mild stress model of depression: a 10-year review and evaluation. *Psychopharmacology*, 134, pp. 319-329.

Willner, P. (1997b). The chronic mild stress procedure as an animal model of depression: valid, reasonably reliable and useful. *Psychopharmacology*, 134, pp. 371-377.

Willner, P. (2005). Chronic Mild Stress (CMS) Revisited: Consistency and Behavioural-Neurological Concordance in the Effects of CMS. *Neuropsychology*, 52, 90-110.